

Université de Sherbrooke

Mécanismes moléculaires conférant aux cellules dendritiques leurs fonctions tolérogènes

Par
Chantal Guindi
Programme d'immunologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph. D.)
en Immunologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Le 23 avril 2013

Membres du jury d'évaluation :

Dr Abdelaziz Amrani : Directeur de recherche,
Département de pédiatrie
Dr Claude Asselin : Examineur externe au programme,
Département d'anatomie et de biologie cellulaire
Dr Patrick P. McDonald : Examineur interne au programme,
Département de médecine
Dr Jacques Thibodeau : Examineur externe,
Département de microbiologie et immunologie,
Université de Montréal



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-499-00407-9

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-499-00407-9

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Résumé

Mécanismes moléculaires conférant aux cellules dendritiques leurs fonctions tolérogènes

Par

Chantal Guindi

Programme d'immunologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph. D.) en immunologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune très répandue dans les pays industrialisés. Cette pathologie résulte d'un dérèglement du système immunitaire qui s'attaque aux cellules bêta du pancréas. Au laboratoire, nous utilisons la souris NOD (non obèse diabétique), une souche de souris qui développe de façon spontanée un DT1 similaire à celui retrouvé chez l'homme. Chez la souris NOD, les cellules dendritiques (DCs) sont impliquées dans le bris de la tolérance. Nous avons démontré auparavant que l'injection de GM-CSF permet de générer de cellules dendritiques semi-matures empêchant le développement du DT1 chez la souris NOD. Nous nous sommes ensuite intéressés au mécanisme d'action du GM-CSF. Nous voulions savoir si le GM-CSF affectait les cellules souches au niveau de la moelle osseuse ou s'il affectait les DCs déjà différenciées. Nous avons donc généré des DCs à partir de la moelle osseuse de souris traitées ou non au GM-CSF et nous avons démontré que le GM-CSF affectait directement les cellules souches de la moelle osseuse. Les DCs obtenues de souris traitées au GM-CSF restent dans un état semi-mature et produisent plus d'IL-10 que les DCs obtenues de souris non traitées. Par la suite, nous avons développé un modèle *in vitro* permettant de générer des DCs similaires à celles retrouvées chez les souris traitées au GM-CSF. Ces DCs ont été dérivées de la moelle osseuse et cultivées avec une faible concentration de GM-CSF (GM/DCs) et ensuite caractérisées comme étant des DCs tolérogènes (tDCs). Ces tDCs ont un phénotype semi-mature et produisent beaucoup de cytokines anti-inflammatoires. Nous avons ensuite étudié les mécanismes moléculaires qui permettaient d'expliquer les différences observées entre les GM/DCs et les DCs immunogènes générées en présence d'IL-4 et de GM-CSF (IL-4/DCs). Nous avons démontré que les protéines composant les complexes NF- κ B sont p52/p65 chez les GM/DCs et p52/p65 et p52/RelB chez les IL-4/DCs. De plus, la sous-unité p65 est préférentiellement recrutée au niveau du promoteur de l'IL-10 chez les GM/DCs tandis qu'on la retrouve sur le promoteur de l'IL-12p35 chez les IL-4/DCs. Nous avons démontré qu'une phosphorylation soutenue de ERK1/2 est responsable de la production d'IL-10 en induisant la liaison à l'ADN du facteur de transcription AP-1. Par la suite, nous avons démontré pour la première fois que le facteur de transcription C/EBP β liait l'ADN chez les GM/DCs. L'utilisation de souris déficientes en C/EBP β nous a permis de démontrer que C/EBP β était essentiel pour la résistance à la maturation des GM/DCs. De plus, nous avons démontré que p38 est essentiel à la production d'IL-10 ainsi que pour la synthèse de C/EBP β . La liaison à l'ADN de C/EBP β est dépendante de la GSK3, une enzyme qui peut être inhibée par la PI3K. Nous avons montré que l'utilisation d'inhibiteurs contre la PI3K n'affectait pas la maturation des GM/DCs, mais qu'elle modulait leur production de cytokines. Lorsque la PI3K est inhibée, les GM/DCs produisent de l'IL-23 et de l'IL-6 en plus d'acquérir la capacité de convertir les T naïfs en Th17. En somme, nous identifions des mécanismes moléculaires clés contrôlant les fonctions tolérogènes des DCs.

Mots clés : cellules dendritiques, facteurs de transcription, diabète de type 1

Table des matières

Résumé.....	ii
Liste des figures	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des abréviations	ix
1 Introduction	1
1.1 Les cellules dendritiques	1
1.2 Facteurs de transcription impliqués dans le développement des DCs	6
1.3 Processus de maturation des DCs.....	6
1.4 Les DCs tolérogènes	9
1.5 Les DCs et les maladies auto-immunes	13
1.6 Le diabète de type 1	14
1.7 Modèles d'études	15
1.8 Développement du DT1.....	16
1.9 Les DCs et le diabète de type 1	19
1.10 Les lymphocytes T et le diabète de type 1	20
1.10.1 Les lymphocytes T CD4+.....	21
1.10.1.1 Les lymphocytes T CD4+ de type Th1	23
1.10.1.2 Les lymphocytes CD4+ de type Th17	24
1.10.1.3 Les lymphocytes T régulateurs (Tregs).....	26
1.10.2 Les lymphocytes T CD8+.....	28
1.10.3 Les lymphocytes B.....	29
1.11 Mécanismes moléculaires impliqués dans les diverses fonctions des DCs.....	30
1.11.1 PI3K.....	32
1.11.2 GSK3	33
1.11.3 ERK1/2	35
1.11.4 p38.....	36
1.11.5 Les STAT	37
1.11.6 NF-κB	38
1.11.7 CREB	42
1.11.8 C/EBP.....	43
1.11.9 AP-1.....	47
2 Prémisses au projet.....	49
3 Rationnelle de recherche.....	49
3.1 Objectif 1	50
3.2 Objectif 2	50
3.3 Objectif 3	50
3.4 Objectif 4	50
4 Chapitre 1. Fonction des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris traitées au GM-CSF	51
4.1 Avant-propos	51
4.2 Matériel et Méthodes	51

4.2.1	Souris	51
4.2.2	Anticorps et cytométrie de flux	52
4.2.3	Traitement au GM-CSF	52
4.2.4	Génération des DCs	52
4.2.5	ELISA	53
4.2.6	Essais de prolifération	53
4.2.7	Transfert adoptif	54
4.2.8	Histopathologie	54
4.2.9	Analyses statistiques	54
4.3	Résultats	55
4.3.1	Phénotype et fonctions des BMDCs générées de souris NOD traitées au GM-CSF	55
4.3.2	Contribution de PD-L1 dans la diminution de la prolifération et de la production de cytokines des lymphocytes T lorsque co-cultivés avec des GM.BMDCs	60
4.3.3	Induction d'une protection à long terme contre le diabète de type 1 par les GM.BMDCs	63
5	Chapitre 2. Caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans les fonctions tolérogènes des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse en présence de GM-CSF	66
5.1	Differential role of NF-κB, ERK1/2 and AP-1 in modulating the immunoregulatory functions of bone marrow-derived dendritic cells from NOD mice	66
5.1.1	Avant-propos	66
5.1.2	Résumé	67
5.1.3	Abstract	67
5.1.4	Introduction	68
5.1.5	Materials and methods	70
5.1.6	Results	73
5.1.7	Discussion	87
5.1.8	Acknowledgments	90
5.1.9	References	91
6	Chapitre 3. Implication de C/EBPβ et de p38 dans les fonctions des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse en présence de GM-CSF	96
6.1	Role of C/EBPβ and p38 in the regulation of the phenotype and IL-10/IL-12 gene expression in bone marrow-derived dendritic cells	96
6.1.1	Avant-propos	96
6.1.2	Résumé	96
6.1.3	Abstract	97
6.1.4	Introduction	99
6.1.5	Materials and Methods	102
6.1.6	Results	106
6.1.7	Discussion	128
6.1.8	References	132
7	Chapitre 4. Implication de la PI3K dans les fonctions des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse générées en présence de GM-CSF	138
7.1	Introduction	138
7.2	Matériel et méthodes:	138
7.2.1	Souris	138
7.2.2	Génération des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDCs)	138
7.2.3	Anticorps et marquages des cellules pour l'analyse par cytométrie de flux	139

7.2.4	Essai d'activation des lymphocytes T	139
7.2.5	Immunobuvardage de type Western	140
7.2.6	Fractionnement cellulaire et extraction nucléaires.....	141
7.2.7	Gel de retardement (EMSA)	141
7.2.8	Production de cytokines par les BMDCs.....	142
7.2.9	Extraction de l'ARNm et analyse des cDNA par PCR en temps réel.....	142
7.2.10	Conversion des lymphocytes T naïfs en Th17	144
7.3	Résultats	144
7.3.1	Caractérisation des fonctions des GM/DCs lors de l'inhibition de la PI3K.....	144
7.3.2	Impact de l'inhibition de la PI3K sur l'activation des facteurs de transcription AP-1, CREB, NF- κ B et C/EBP	148
7.3.3	Modulation de l'expression génique et de la production de l'IL-10 et de l'IL-12 lors de l'inhibition de la PI3K.....	150
7.3.4	Modulation de l'expression de l'IL-23p19 et de la production d'IL-23 lors de l'inhibition de la PI3K.....	152
7.3.5	Production de cytokines impliquées dans la conversion de lymphocytes T naïfs en Th17	154
7.3.6	Conversion des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th17.....	156
7.3.7	Implication de C/EBP β dans la production de cytokines menant à la conversion des lymphocytes T CD4 ⁺ naïfs en Th17	159
7.3.8	Effet de l'inhibition de la PI3K sur la production de cytokines par les GM/DCs de souris C/EBP β ^{-/-} ou C/EBP β ^{+/-}	163
7.3.9	Conversion des lymphocytes T naïfs en Th17.....	167
8	Discussion	169
9	Conclusion	184
10	Remerciements	186
11	Références	187
12	Annexe	225
12.1	GM-CSF Induces Bone Marrow Precursors of NOD Mice to Skew into Tolerogenic Dendritic Cells that Protect Against Diabetes	225

Liste des figures

Introduction

Figure 1. Maturation des DCs.	8
Figure 2. Cascades d'évènements menant au développement du diabète de type 1	18
Figure 3. Implication des cytokines dans la détermination du type de lymphocytes T CD4 ⁺	22
Figure 4. Schématisation des voies de signalisation activées par le TLR4.....	31
Figure 5. Représentation schématique des deux voies d'activation de NF-κB.....	40
Figure 6. Représentation schématique des différents isoformes de C/EBP.....	46

Chapitre 1. Fonction des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris traitées au GM-CSF

Figure 1. Phénotype et fonctions des PBS.BMDCs et des GM.BMDCs.	56
Figure 2. Prolifération et production de cytokines par des lymphocytes T 8.3-CD8 ₊ co-cultivés avec des GM.BMDCs ou des PBS.BMDCs.....	58
Figure 3. Expression et fonction de PD-L1 et PD-L2 chez les GM.BMDCs et les PBS.BMDCs.....	62
Figure 4. Prévention du développement du diabète de type 1 par les GM.BMDCs stimulées au LPS.....	64

Chapitre 2. Caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans les fonctions tolérogènes des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse en présence de GM-CSF

Fig. 1. Phenotype and cytokine production by bone marrow-derived GM/DCs and IL-4/DCs.....	74
Fig. 2. GM/DCs of NOD mice exhibit a decreased capacity to stimulate 8.3-CD8 ⁺ T-cells and greater capacity to induce Treg differentiation.	77
Fig. 3. ERK activation is responsible for the preferential increased production of IL-10 by GM/DCs.	81
Fig. 4. Analysis of NF-κB DNA binding activity in LPS-stimulated GM/DCs and IL-4/DCs.	84
Fig. 5. Analysis of p65 NF-κB subunit binding to IL-10 and IL-12p35 promoter in GM/DCs and IL-4/DCs.....	86

Chapitre 3. Implication de C/EBPβ et de CREB dans les fonctions des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse en présence de GM-CSF

Figure 1. C/EBPβ DNA binding activity is induced in LPS-stimulated GM/DCs.	108
Supplementary Figure 1. Cellular localization of C/EBPβ in GM/DCs and IL-4/DCs.	111
Figure 2. Signaling pathways involved in the activation of C/EBPβ and CREB in GM/DCs.....	113
Supplementary Figure 2. Effect of p38 and GSK-3 inhibitors on CREB activity in LPS-stimulated GM/DCs.	115
Figure 3. Inhibition of p38 or GSK3 activity regulates anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines.....	117
Supplementary Figure 3. Effects of GSK3 inhibition on cytokine production in GM/DCs.	119
Figure 4. Inhibition of GSK3 but not p38 enhances GM/DCs maturation status.	121
Figure 5. Effect of C/EBPβ deficiency on the maturation status of GM/DCs.	123
Figure 6. Effect of C/EBPβ deficiency on IL-10 and IL-12 gene expression by GM/DCs.	125
Figure 7. Effect of C/EBPβ deficiency on cytokine secretion by GM/DCs.....	127

Chapitre 4. Implication de la PI3K dans les fonctions des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse générées en présence de GM-CSF

Figure 1. Rôle de la PI3K dans les fonctions des DCs tolérogènes de souris NOD.	146
Figure 2. Modulation des voies de signalisation lors de l'inhibition de la PI3K chez les GM/DCs.	149
Figure 3. Effet de l'inhibition de la PI3K sur la modulation de l'expression génique et de la sécrétion des cytokines chez les GM/DCs.	151
Figure 4. Effet de l'inhibition de PI3K sur l'expression génique de l'IL-23 p19 et la sécrétion de l'IL-23 par les GM/DCs.	153
Figure 5. Expression et production d'IL-6 et de TGF- β lors de l'inhibition de la PI3K chez les GM/DCs.	155
Figure 6. Effet de l'inhibition de la PI3K chez les GM/DCs sur leur potentiel de conversion des lymphocytes T CD4 ⁺ naïfs en Th17.	157
Figure 7. Rôle de la PI3K et de C/EBP β dans la régulation de l'expression génique de cytokines chez les GM/DCs	161
Figure 8. Implication de la PI3K dans la production de cytokines régulées par C/EBP β	165
Figure 9. Conversion des lymphocytes T CD4 ⁺ par les GM/DCs de souris C/EBP $\beta^{+/+}$ et de souris C/EBP $\beta^{-/-}$	168

Discussion

Figure 1. Résumé schématique des résultats présentés dans le chapitre 2	173
Figure 2. Représentation schématique des résultats obtenus dans le chapitre 3.	175
Figure 3. Résumé des résultats présentés dans le chapitre 4	180

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1. Caractéristiques des différents types de DCs.	3
Tableau 2. Expression des TLR par les DCs humaines et murines.....	5

Chapitre 3. Implication de C/EBP β et de CREB dans les fonctions des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse en présence de GM-CSF

Table 1. Sequence of the primers used for the real-time PCR	105
---	-----

Chapitre 4. Implication de la PI3K dans les fonctions des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse générées en présence de GM-CSF

Tableau 1. Amorces et Tm utilisées dans les réactions de PCR en temps réel.	143
--	-----

Liste des abréviations

APC	Cellule présentatrice d'antigène
AP-1	Activator protein-1
ATF1	Activating transcription factor 1
β_2 M	Bêta-2-microglobuline
BB	Bio-Breeding
BMDC	Bone marrow derived dendritic cell
CIITA	Class II, major histocompatibility complex, transactivator
CCR	Récepteur de chimiokine de type CC
CD	Cluster of differentiation
Ci	Unité de mesure de radioactivité (Curie)
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPM	Compte par minute
CRE	cAMP regulated element
CREB	cAMP regulated element binding protein
CREM	cAMP regulated element modulator
CTLA-4	Cytotoxic lymphocyte antigen-4
DC	Cellule dendritique
DT1	Diabète de type 1
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FBS	Sérum bovin foetal
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
FLT3	FMS-like tyrosine kinase
FoxP3	Forkhead box protein 3
GAD	Glutamate acid decarboxylase
GITR	Glucocorticoid-induced TNF-like receptor
GM-CSF	Granulocytes Macrophages Colony Stimulating Factor
GM/DCs	Cellules dendritiques générées avec du GM-CSF
GSK3	Glycogène synthétase kinase 3
Gy	Unité de mesure de radioactivité (Gray)
HLA	Human leukocyte antigen (CMH humain)
ICA512	Islet cell antibody 52
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
I κ B	Inhibiteur de NF- κ B
IKK	Kinases de I κ B
IL-	Interleukine
IL-4/DCs	Cellules dendritiques générées avec du GM-CSF et de l'IL-4
LAG-3	Lymphocyte activation gene protein-3
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MFI	Intensité de fluorescence moyenne
NF- κ B	Facteur nucléaire kappa B

NIK	NF- κ B inducing kinase
NEMO	NF- κ B essential modulator (autre nom IKK- γ)
NOD	Non obèse diabétique
NOR	Non obèse résistant
PBS	Tampon phosphate salin
PercP	Peridinin-chlorophyll-protein complex
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
SCID	Severe combined immune deficiency
TCR	Récepteurs des cellules T
TGF- β	Transforming growth factor beta
TH	T helper
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
Treg	Lymphocytes T régulateurs
VIP	Vasoactive intestinal peptide

1 Introduction

1.1 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules présentatrices d'antigènes par excellence (Banchereau *et al.*, 2000). Ces dernières ont été découvertes par le Dr Steinman en 1973 (Steinman et Cohn, 1973) ce qui lui valut le prix Nobel de médecine en 2011. Ces cellules font le lien entre le système immunitaire inné et acquis et permettent d'établir une mémoire immunologique (Banchereau et Steinman, 1998; Bell *et al.*, 1999; Hart, 1997). Quatre stades de développement permettent de caractériser les DCs *in vivo*. Le premier stade de développement comprend les précurseurs de la moelle osseuse. Le deuxième stade comprend les précurseurs de DCs circulant dans le sang, la lymphe ainsi que dans les tissus lymphoïdes. Suite à l'exposition à des pathogènes, ces précurseurs produisent des quantités importantes de cytokines. Le troisième stade comprend les DCs immatures qui résident dans les tissus et qui possèdent une grande capacité phagocytaire. Le quatrième stade de développement comprend les cellules dendritiques matures que l'on retrouve dans les organes lymphoïdes secondaires. Celles-ci expriment des quantités importantes de molécules de costimulation ainsi que de molécules du CMH de classe II. Ces cellules sont responsables de la présentation d'antigènes aux lymphocytes (Banchereau *et al.*, 2000).

Chez la souris, deux voies de différenciation des cellules dendritiques ont été identifiées ce qui mène à la génération de deux types de DCs différents soit les DCs myéloïdes et les DCs lymphoïdes. Les DCs myéloïdes ont été découvertes suite à la culture *in vitro* de cellules de la moelle osseuse en présence de GM-CSF qui donne lieu à la génération de granulocytes/macrophages et de DCs (Inaba *et al.*, 1992; Scheicher *et al.*, 1992). Les DCs peuvent aussi provenir de précurseurs lymphoïdes (Ardavin *et al.*, 1993; Saunders *et al.*, 1996; Vremec *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1996). Les fonctions, la localisation tissulaire ainsi que le phénotype permettent de différencier les DCs myéloïdes et lymphoïdes. Les DCs plasmacytoïdes (pDCs) sont aussi retrouvées chez l'homme et la souris. Ces DCs auraient comme origine la lignée lymphoïde, car elles expriment plusieurs gènes comme le gène Rag qui est impliqué dans

le réarrangement de la chromatine chez les lymphocytes T et B (Corcoran *et al.*, 2003; Pelayo *et al.*, 2005; Shigematsu *et al.*, 2004). Les types de DCs peuvent encore être divisés selon le tissu où on les retrouve, ou encore selon leur capacité à migrer. Les DCs conventionnelles (cDCs) peuvent être de type migratoire ou résident. Les DCs migratoires résident dans les tissus et captent les antigènes puis migrent vers les ganglions pour présenter l'antigène aux lymphocytes T. Les DCs qui résident dans les tissus lymphoïdes (rate, thymus, ganglions) proviennent de précurseurs présents dans les tissus. Ces DCs peuvent être divisées en CD4⁺ DCs, CD8⁺ DCs ou CD4⁺CD8⁺ DCs (Vremec *et al.*, 2000; Vremec *et al.*, 1992). Les DCs CD4⁺ et les DCs CD4⁺ et CD8⁺ peuvent parfois présenter les antigènes via le CMH de classe I tandis que les CD8⁺ DCs sont connues pour effectuer de la présentation croisée et pour activer les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (Allan *et al.*, 2003; den Haan *et al.*, 2000; Edelson *et al.*, 2010; GeurtsvanKessel *et al.*, 2008; Kim et Braciale, 2009; Smith *et al.*, 2003). Le tableau 1 montre les différents types de DCs conventionnelles ainsi que leurs caractéristiques.

DC subset	DC type	CD8a	CD103	CD205	EPCAM (CD326)	CD11b	B220 or CD45RA	DC-SIGN	Langerin (CD207)	Antigen presentation	Major cytokine produced
pDCs	Lymphoid- resident DCs	+/-	-	-	-	-	+	++	-	Poor	IFN α
CD8a ⁺ DCs	Lymphoid- resident DCs	+	low	+	-	+	-	-	+/-	Cross- presentation on MHC class I; expression of cystatin C	IL-12p70, IFN γ
CD4 ⁺ DCs	Lymphoid- resident DCs	-	-	-	-	+	-	-	-	Presentation on MHC class II	
DN DCs	Lymphoid- resident DCs	-	-	-	-	+	-	-	-	Presentation on MHC class II	
CD11b ⁺ DCs	Migratory DCs	-	+/-	+	-	+	-	ND	-	Presentation on MHC class II	
CD103 ⁺ DCs • Lung • Intestine	Migratory DCs	-	+	++	+/-	-	-	-	+	Cross- presentation on MHC class I	
Langerhans cells	Migratory DCs	-	-	++	+	+	-	-	++	Presentation of self antigens for tolerance induction	IL-10
Monocyte- derived DCs	Induced by inflammation	-	-	-	-	+	-	+	-	Cross- presentation	TNF

DC, dendritic cell; DC-SIGN, DC-specific ICAM3-grabbing non-integrin; DN, double-negative; EPCAM, epithelial cell adhesion molecule; IFN α , interferon α ; IL, interleukin; ND, not determined; pDC, plasmacytoid DC

Tableau 1. Caractéristiques des différents types de DCs.

Les différents types de DCs sont présentés ainsi que les marqueurs de surface qu'elles expriment et leur capacité à présenter des antigènes et, le cas échéant, les cytokines qu'elles produisent.
Extrait de (Belz et Nutt, 2012)

D'autres marqueurs comme DEC205 et CD1d sont fortement exprimés de façon constitutive chez les DCs lymphoïdes (Maraskovsky *et al.*, 1996; Pulendran *et al.*, 1997; Vremec et Shortman, 1997; Wu *et al.*, 1996). Par contre, leur expression peut être induite chez les DCs myéloïdes en culture *in vitro* (Maraskovsky *et al.*, 1996; Pulendran *et al.*, 1997; Vremec et Shortman, 1997; Wu *et al.*, 1996). Les DCs lymphoïdes sont retrouvées dans la zone riche en lymphocytes T située dans les tissus lymphatiques périartériolaires de la rate et des ganglions lymphatiques (De Smedt *et al.*, 1996; Leenen *et al.*, 1998; Pulendran *et al.*, 1997). Les DCs myéloïdes sont plutôt retrouvées dans la zone marginale de la rate (De Smedt *et al.*, 1996; Leenen *et al.*, 1998; Pulendran *et al.*, 1997).

Les sous-populations de DCs expriment différents récepteurs de type TLR (Toll-like receptors), ce qui leur permet de répondre à différents stimuli comme le LPS et les molécules d'ARN double brin pour ne nommer que ceux-ci. Le tableau 2 présente les niveaux d'expression relative de ces différents TLR par les sous-populations de DCs humaines et murines. Chez la souris, les DCs myéloïdes expriment plus fortement le TLR3 que les DCs plasmacytoïdes. Ces dernières expriment plus fortement le TLR7 que les DC myéloïdes. La stimulation via ces TLR peut entraîner la production de médiateurs différents. Par exemple, la stimulation des DCs plasmacytoïdes humaines via TLR7 induit une forte production d'interféron de type 1 mais aucune production d'IL-12. Par contre, chez les DCs myéloïdes humaines, la stimulation via TLR7 induit une forte production d'IL-12 sans production d'interféron de type 1 (Mazzoni et Segal, 2004). L'expression différentielle des TLR permet aux sous-populations de DCs de répondre à différents stimuli ce qui permet d'établir une réponse immunitaire adaptée au pathogène qui infecte l'hôte. De plus, les sous-populations de DCs réagissent différemment selon le TLR activé. Par exemple, les DCs stimulées avec de l'ARN double brin, un activateur du TLR3, produiront des interférons de type 1 impliqués dans la réponse immunitaire antivirale. Si ces mêmes DCs sont stimulées avec un dérivé bactérien comme le LPS, qui active le TLR4, aucune production d'interféron de type 1 ne sera observée (Mazzoni et Segal, 2004).

	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9
Human DC Subsets									
Myeloid:	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CD11c+, CD14-, CD1a+									
Plasmacytoid:	+	-	-	-	-	+	+	-	+
CD11c-, BDCA2+, CD123+									
Mouse DC Subsets									
Classical:									
LY6C- B220-									
CD4- CD8+ CD11b-	+	+	+	+	+/-	+	-	+	+
CD4- CD8- CD11b+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD4+ CD8- CD11b+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+
Plasmacytoid:									
LY6C+ B220+ CD11b-	+	+	-	+/-	+	+	+	+	+
Langerhans-like:									
CD8-int CD11b+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Tableau 2. Expression des TLR par les DCs humaines et murines.

Niveau d'expression des TLR (Toll-like receptors) à la surface des différentes sous-populations de cellules dendritiques humaines et murines (nd : non déterminé). Extrait de (Mazzoni et Segal, 2004)

1.2 Facteurs de transcription impliqués dans le développement des DCs

Plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation des DCs. Le facteur de transcription Ikaros est essentiel au développement des DCs (Allman *et al.*, 2006). L'expression d'un dominant négatif d'Ikaros résulte en une perte totale de DCs conventionnelles (Allman *et al.*, 2006). Cependant, d'autres études montrent qu'une mutation rendant la protéine non fonctionnelle cause plutôt une absence des DCs CD8⁻ et des pDCs et que la population de DCs CD8⁺ est encore présente (Allman *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 1997)(Allman *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 1997). Ikaros est donc impliqué dans la génération des DCs CD8⁻ et des pDCs mais pas dans le développement des DCs CD8⁺. La voie de NF-κB est aussi très importante pour le développement des DCs, particulièrement RelB. Les souris déficientes en RelB présentent un défaut au niveau de la génération des DCs CD4⁺CD8⁻ mais pas des DCs CD4⁻CD8⁺ ou des CD4⁻CD8⁻ (DCDN) (Burkly *et al.*, 1995; Weih *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1998). Les facteurs de transcription de la famille des IRF sont aussi impliqués dans la différenciation des DCs. Par exemple, IRF-8 est impliqué dans la génération des DCs CD4⁻CD8⁺ et des pDCs, IRF-4 est impliqué dans la génération des pDCs de la rate et IRF-2 et IRF-4 sont impliqués dans la différenciation des DCs CD4⁺CD8⁻ (Ichikawa *et al.*, 2004; Schiavoni *et al.*, 2004; Schiavoni *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2004).

Un autre facteur de transcription impliqué dans la différenciation des DCs est le zbtb46. Ce facteur de transcription fait partie de la famille BTB-ZF (broad complex, Tramtrack, Brick-à-Brac and Zinc finger) (Kelly et Daniel, 2006). Ce facteur est exprimé par tous les types de cDCs mais pas par les pDCs et permet de les distinguer de tous les autres types de cellules immunitaires mononucléées telles que les monocytes, les macrophages et les cellules lymphoïdes et myéloïdes (Satpathy *et al.*, 2012).

1.3 Processus de maturation des DCs

Plusieurs stimuli peuvent induire la maturation des DCs tel que la phagocytose, la macropinocytose et la stimulation par divers médiateurs solubles. *In vitro*, il a été démontré que

la maturation des DCs peut être induite par plusieurs stimuli comme le LPS, des anticorps anti-CD40, le FLT3, des molécules d'ADN et les cytokines pro-inflammatoires (Bell *et al.*, 1999). *In vivo*, les DCs immatures qui résident dans les tissus sont des cellules sentinelles qui ont pour fonction de détecter la présence de pathogènes ou la présence de dommages tissulaires. Ces cellules expriment des récepteurs de reconnaissance de patrons moléculaires (*pattern recognition receptors*) qui détectent les PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) et les DAMPs (*damage-associated molecular patterns*); ceci active diverses cascades de signalisation induisant la maturation des DCs (McIlroy *et al.*, 2005). La maturation des DCs est caractérisée par des changements phénotypiques et fonctionnels. Parmi ces changements, on note la perte de la capacité de phagocytose due à une diminution de l'expression de certaines molécules de surface comme les récepteurs Fcγ et les récepteurs de mannose (Banchereau *et al.*, 2000) (figure 1). Les DCs immatures accumulent également des quantités importantes de molécules de CMH II au niveau des vésicules intracellulaires (Inaba *et al.*, 1997; Kleijmeer *et al.*, 1995). Les antigènes captés par les DCs sont dirigés vers ces vésicules, ce qui promeut le détachement de la chaîne invariante associée au CMH II et permet à ce dernier de lier les peptides dérivés de l'antigène phagocyté (Castellino *et al.*, 1997; Cresswell, 1996). La maturation des DCs implique un export massif des molécules de CMH II et des molécules de costimulation au niveau de la membrane plasmique (Banchereau *et al.*, 2000). Les molécules de CMH II sont rapidement internalisées chez les DCs immatures alors que chez les DCs matures, ces molécules peuvent rester pendant plusieurs jours à leurs surfaces (Cella *et al.*, 1997; Inaba *et al.*, 1997; Pierre *et al.*, 1997; Winzler *et al.*, 1997). Le processus de maturation des DCs est aussi caractérisé par l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation comme celles de la famille B7 (CD80 et CD86), de CD40, OX40L et ICOSL (Hackstein et Thomson, 2004).

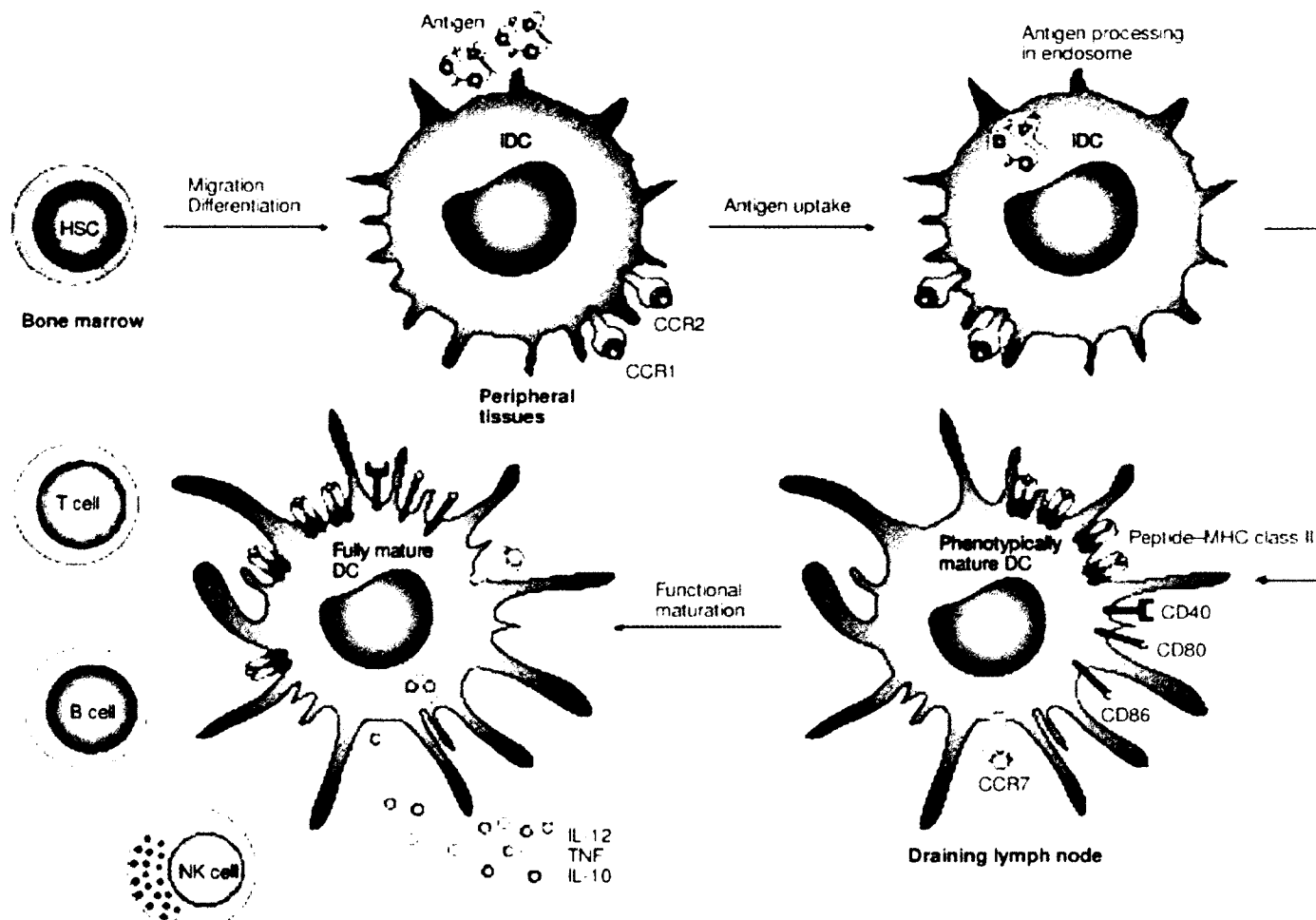


Figure 1. Maturation des DCs.

Les DCs immatures captent les antigènes par différents mécanismes comme la phagocytose et la macropinocytose. Les DC immatures expriment plusieurs récepteurs qui favorisent cette capture d'antigènes comme les récepteurs Fcγ. La maturation implique une expression à la surface de molécules qui étaient principalement gardées à l'intérieur de la DC immature. Les molécules du CMH favorisent la présentation d'antigène tandis que les molécules de costimulation, comme le CD80, procurent le 2^e signal nécessaire à l'activation des lymphocytes T. Extrait de (Hackstein et Thomson, 2004).

Le processus de maturation implique l'activation de plusieurs voies de signalisations induites entre autres par la reconnaissance des signaux de danger. Parmi ces voies de signalisation, on note la voie NF- κ B (présenté plus bas) et la voie des IRF (Interferon Regulating Factor) qui sont particulièrement importantes pour l'induction de l'expression de plusieurs gènes comme les IFN- α et β et plusieurs autres cytokines (Re et Strominger, 2004; Salter et Watkins, 2009).

En plus de ces changements phénotypiques, la maturation des DCs est accompagnée d'une forte production de plusieurs cytokines (Banchereau *et al.*, 2000), de l'augmentation de l'expression de certains récepteurs de chimiokines, comme le CCR7, et de la migration des DCs vers les ganglions lymphatiques (Alvarez *et al.*, 2008). Une étude récente a montré que la pré-incubation de DCs immatures avec des cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β) et de la PGE₂, suivie d'une stimulation par le poly I:C permet de générer des DCs qui induisent une forte réponse immune de type Th1 et qui migrent plus efficacement en réponse à CCL21 et à CXCL12 comparativement aux DCs simplement stimulées au poly I:C. (Kim *et al.*, 2010). Cette étude démontre, pour la première fois, que les cytokines présentes dans l'environnement des DCs influencent leur maturation et surtout leurs fonctions.

1.4 Les DCs tolérogènes

Les DCs tolérogènes (tDCs) sont une sous-population de DCs dont la fonction principale est le maintien de la tolérance immune. Les tDCs permettent de maintenir l'équilibre entre une tolérance complète, qui empêcherait le corps de se défendre contre des pathogènes dangereux, et une tolérance trop faible qui favoriserait le développement de maladies auto-immunes. Plusieurs types de DCs tolérogènes existent et chaque type possède des caractéristiques particulières. Les propriétés des DCs sont liées à l'environnement dans lequel elles se retrouvent, ce qui explique qu'un type de DCs peut être à la fois immunogène et tolérogène selon les cytokines ou les stimuli présents. Chez la souris, on retrouve des DCs tolérogènes plasmacytoïdes ou des DCs d'origine lymphoïde qui sont caractérisées par l'expression de CD4⁺, CD8⁺ ou des DCs CD4⁺CD8 α ⁻. Des études ont montré que les DCs CD8⁺ peuvent induire la conversion de T naïfs en Tregs en présence de TGF- β (Shortman et Heath, 2010; Yamasaki *et al.*, 2008) alors que d'autres études

ont montré que les pDCs sont impliquées dans la tolérance orale et la tolérance lors de transplantations (Goubier *et al.*, 2008; Ochando *et al.*, 2006; Swiecki et Colonna, 2010). De façon similaire, les DCs plasmacytoïdes immatures peuvent induire la tolérance spécifique aux antigènes du soi via l'induction de Tregs (Goubier *et al.*, 2008; Liu, 2005; Ochando *et al.*, 2006).

Dans les poumons, le tractus gastro-intestinal et la peau, on trouve des DCs migratoires CD103⁺. Ces DCs CD103⁺ captent les antigènes en périphérie et migrent dans les organes lymphoïdes secondaires pour les présenter aux lymphocytes T. Comme les pDCs, les DCs CD103⁺ expriment non seulement l'enzyme IDO, mais sécrètent l'acide rétinoïque qui induit la conversion des lymphocytes T naïfs en Tregs (Matteoli *et al.*, 2010; Siddiqui et Powrie, 2008). Il a été suggéré que les DCs plasmacytoïdes auraient le plus grand potentiel tolérogénique suivies par les DCs CD103⁺ et les DCs CD8⁺ alors que les DCs CD11b⁺ auraient le plus faible potentiel tolérogénique (Maldonado et von Andrian, 2010).

Dans le thymus, lieu de la sélection positive et négative des lymphocytes T, on retrouve les DCs au niveau de la médulla (Fairchild et Austyn, 1990). Les DCs présentent les antigènes du soi aux lymphocytes T et sont impliquées dans la sélection négative des lymphocytes T autoréactifs (Matzinger et Guerder, 1989). Il a été démontré que l'expression du CMH II I-E chez les DCs de la médulla du thymus est suffisante pour induire la délétion clonale des lymphocytes T CD4⁺ reconnaissant de façon antigène spécifique cette molécule (Brocker *et al.*, 1997). De plus, suite à leur injection, les DCs pulsées avec un peptide de l'ovalbumine sont recrutées dans la médulla du thymus et induisent la délétion clonale des lymphocytes T CD4⁺ auto-réactifs pour ce peptide (Bonasio *et al.*, 2006). L'équipe de Watanabe (Watanabe *et al.*, 2005a) a démontré que la TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*), sécrétée au niveau des corpuscules de Hassal, conditionne les DCs et favorise la prolifération des Tregs et la conversion des lymphocytes T naïfs en Tregs. *In vitro*, les DCs humaines, isolées de sang de sujets sains et traitées à la TSLP expriment fortement le CMH II et les molécules de costimulation comparativement aux cellules non traitées. Les DCs traitées à la TSLP sécrètent une quantité négligeable d'IL-12p70 et promeuvent la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes Tregs (Watanabe *et al.*, 2005b). Dans notre laboratoire (Besin *et al.*, 2008) nous avons montré que l'injection de TSLP à des souris NOD permet de les protéger contre le DT1 et que cette protection est médiée par les DCs. Il a aussi été

démontré que la TSLP favorise la maturation des DCs qui induisent une réponse immunitaire de type Th2 et une différenciation des Tregs qui contribuent à empêcher le développement de la maladie.

La tolérance immune périphérique est assurée par plusieurs mécanismes qui empêchent l'activation des lymphocytes T auto-réactifs. Les DCs jouent un rôle crucial dans le maintien de cette tolérance périphérique et dans le maintien de l'homéostasie. En effet, la déplétion des DCs entraîne une pathologie auto-immune systémique mortelle caractérisée par une perte de poids, une splénomégalie et une augmentation du nombre de lymphocytes T de type Th1 et Th17. (Ohnmacht *et al.*, 2009). Outre la conversion des lymphocytes T naïfs en Tregs, les DCs tolérogènes peuvent aussi induire l'anergie et la déletion clonale des lymphocytes T auto-réactifs.

Le stade de maturation des DCs est très important pour déterminer leur potentiel tolérogène. Dans des conditions non-inflammatoires, les DCs sont dans un état immature caractérisé par un faible niveau d'expression des molécules de costimulation et du CMH II. La faible expression de ces molécules chez les DCs immatures est en partie responsable de leur faible capacité à activer les lymphocytes T ou à induire leur anergie (Steinman *et al.*, 2000). De plus, plusieurs études ont montré que les DCs immatures contribuent à l'induction et au maintien de la tolérance immunitaire en favorisant la déletion clonale des lymphocytes T auto-réactifs et en augmentant le nombre de Tregs (Dhodapkar *et al.*, 2001; Hawiger *et al.*, 2001; Jonuleit *et al.*, 2000; Mahnke *et al.*, 2003).

De façon similaire, les DCs plasmacytoïdes immatures peuvent induire la tolérance spécifique aux antigènes du soi via l'induction de Tregs (Goubier *et al.*, 2008; Liu, 2005; Ochando *et al.*, 2006). Chez la souris, plusieurs types de DCs tolérogènes ont été identifiés dans la rate. Par exemple, il a été rapporté que les DCs immatures de type CD11c⁺DEC205⁺CD11b⁻CD8⁺ n'induisent pas une forte activation des lymphocytes T *in vitro* comparativement aux DCs CD11c⁺DEC205⁻CD11b⁻CD8⁺ (Kronin *et al.*, 1996; Rizzitelli *et al.*, 2006; Shortman et Heath, 2010). D'autres types de DCs tolérogènes ont été décrits, par exemple celles qui résident dans les muqueuses ou dans des sites immunoprivilégiés tels que la chambre antérieure de l'oeil et les poumons. Dans les poumons, les DCs CD103⁺ peuvent induire des Tregs contrairement aux DCs

CD103⁺ qui favorisent une réponse inflammatoire aux antigènes présents via leur production de cytokines (Akbari *et al.*, 2001; Buenafe et Bourdette, 2007; Hammad et Lambrecht, 2008). Au niveau de l'oeil, un sous-type spécifique de DCs exprimant faiblement le CMH II et les molécules de costimulation permet d'induire la tolérance (Novak *et al.*, 2003).

Les DCs tolérogènes peuvent être générées *in vitro* en cultivant les DCs en présence de cytokines ou de molécules anti-inflammatoires. Ainsi, il a été démontré que la culture des cellules dérivées de la moelle osseuse en présence de molécules telles que la vitamine A (Agace et Persson, 2012; Zeng *et al.*, 2012), la vitamine D3, la prostaglandine E₂, l'IDO, l'IL-10, le TGF- β , l'acide rétinoïque, des facteurs de croissance hépatiques et le peptide intestinal vasoactif (VIP) permet de générer plusieurs types de DCs tolérogènes (Akbari *et al.*, 2001; Geissmann *et al.*, 2003; Morelli et Thomson, 2007; Penna *et al.*, 2007; Rutella *et al.*, 2006a; Sato *et al.*, 2002; Steinbrink *et al.*, 2002).

Wakkach *et al.* ont montré que l'IL-10 permet la génération de DCs tolérogènes exprimant faiblement CD11c et fortement CD45RB (CD11c^{low}, CD45RB^{hi}) (Wakkach *et al.*, 2003). De plus, le groupe de Girolomoni a montré que l'IL-10 peut avoir un effet autocrine sur les DCs qui la produisent en limitant leur processus de maturation (Corinti *et al.*, 2001). Cette étude a montré que les DCs matures accumulent l'ARN messager du récepteur de l'IL-10 et qu'il y a une accumulation intracellulaire de ce récepteur. Le contrôle de l'expression ou de la localisation de ce récepteur serait, selon les auteurs, une façon clé de manipuler les fonctions biologiques des DCs (Corinti *et al.*, 2001). Nous avons également montré que les cellules dendritiques générées avec du GM-CSF et de l'IL-4 en présence d'IL-10, puis stimulées au LPS, ont un phénotype moins mature que les DCs générées avec du GM-CSF et l'IL-4 (Guindi et coll., données non publiées)

Enfin, le neuropeptide VIP a également la capacité d'induire des DCs tolérogènes (Chorny *et al.*, 2005). Le VIP est relâché par les cellules immunitaires en réponse à un antigène et possède les caractéristiques d'un agent anti-inflammatoire (Chorny *et al.*, 2005). Les BMDC exposées à ce peptide se différencient en DCs qui résistent à la maturation et qui produisent des quantités importantes d'IL-10 (Chorny *et al.*, 2005). Ces DCs expriment fortement la molécule CMH de

classe II mais expriment faiblement les molécules de costimulation et sont capables d'induire la génération des Tregs (Chorny *et al.*, 2005)

En somme, les DCs tolérogènes ont un rôle important dans la protection contre le développement de maladies auto-immunes. Les fonctions tolérogènes des DCs doivent cependant, être contrôlées, car le système immunitaire doit tout de même pouvoir nous défendre contre les pathogènes.

1.5 Les DCs et les maladies auto-immunes

Les DCs représentent la pierre angulaire du système immunitaire; elles sont spécialisées dans la présentation d'antigènes ainsi que dans l'activation des lymphocytes. Plusieurs maladies auto-immunes résultent de l'activation de lymphocytes auto-réactifs par les DCs et de la production d'auto-anticorps dirigés contre les antigènes présentés par les DCs.

Plusieurs études ont démontré l'implication des DCs dans le développement du lupus érythémateux disséminé (Carvalho *et al.*, 2012; Fehr *et al.*, 2012). Il a été montré que l'activation des pDCs via les récepteurs TLR 7, 8 ou 9 induit une activation des lymphocytes B, ce qui mène à la production d'auto-anticorps (Barrat *et al.*, 2005; Ehlers *et al.*, 2006). Une autre étude a montré que les DCs générées à partir des monocytes de patients atteints du lupus sont dans un état anormal de maturation caractérisé par une augmentation de l'expression des molécules de costimulation ainsi que du CMH de classe II (Ding *et al.*, 2006). De plus, le sérum de patients atteints de cette pathologie peut induire la différenciation de monocytes en DCs et ce phénomène est dépendant de l'IFN- α . Les auteurs suggèrent que ces DCs seraient plus efficaces pour capturer les antigènes dérivés des cellules en apoptose et les nucléosomes présents dans le sang des malades, ainsi que pour les présenter aux lymphocytes T CD4⁺ autoréactifs (Blanco *et al.*, 2001).

La sclérose en plaques est une maladie auto-immune causée par la démyélinisation des neurones, ce qui entraîne des déficiences motrices et sensorielles. Un modèle murin consistant à injecter des composantes de la myéline chez des animaux prédisposés a permis d'étudier cette pathologie. Suite à l'injection, on observe une activation des lymphocytes T CD4⁺ (Kuchroo *et al.*, 2002). La délétion des pDCs durant les crises ou durant une phase de latence aggrave la pathologie. Ces cellules isolées du système nerveux central peuvent inhiber la capacité des DC myéloïdes à convertir les lymphocytes T naïfs en Th1 ou en Th17 (Bailey-Bucktrout *et al.*, 2008). Ces données confèrent un rôle protecteur aux pDCs dans cette pathologie. L'analyse de pDCs de patients atteints de sclérose en plaques a révélé l'existence de deux populations de pDCs. La première, pDC1, est caractérisée par l'expression de CD123^{hi} et CD58^{low} tandis que la deuxième, pDC2, est caractérisée par l'expression de CD123^{low} et CD58^{high}. Les pDC1 promeuvent l'induction de Tregs produisant de l'IL-10 tandis que les pDC2 induisent des Th17 (Schwab *et al.*, 2010). Dans les conditions pathologiques, on retrouve plus de pDC2 alors que dans des conditions normales on retrouve plus de pDC1.

Dans le cas de la maladie de Graves, il a été démontré que les DCs jouent un rôle très important dans le développement de l'hyperthyroïdie caractéristique de cette pathologie. Lorsque les DCs sont transduites avec le gène qui code pour le récepteur à la thyrotrophine (TSHR), le principal auto-antigène retrouvé dans cette pathologie, et ensuite transférées à des souris BALB/c, non susceptibles à cette pathologie, on observe une production importante d'auto-anticorps reconnaissant le TSHR, ce qui induit la pathologie (Kita-Furuyama *et al.*, 2003).

Les DCs jouent enfin un rôle important dans le développement du diabète auto-immun, qui est le sujet principal de nos travaux de recherche. Les prochaines sections expliquent la maladie et le rôle des principales populations du système immunitaire impliquées dans le développement de cette pathologie.

1.6 Le diabète de type 1

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune caractérisée par la destruction des cellules bêta du pancréas, qui produisent l'insuline. Il en résulte une augmentation de la glycémie sanguine et

une soif intense accompagnée par une polyurie (Bluestone *et al.*, 2010). L'incidence de la maladie varie beaucoup selon les pays. Par exemple, l'incidence est de 35 cas sur 100 000 personnes en Nouvelle-Écosse/Labrador, de 30 cas par 100 000 personnes en Suède et de 41 par 100 000 personnes en Finlande (Newhook *et al.*, 2008). Les plus faibles incidences de la maladie sont retrouvées dans certains pays d'Afrique comme par exemple, la Tanzanie où 1,5 cas sont retrouvés par 100 000 personnes chez la population noire (Swai *et al.*, 1993). Ces différences peuvent être expliquées par l'exposition précoce des enfants au lait de vache, le niveau d'hygiène, les capacités de diagnostic et la mortalité infantile (Knip *et al.*, 2011). Selon l'association américaine du diabète, 1,9 million de nouveaux cas de diabète ont été diagnostiqués chez des personnes âgées de moins de 20 ans en 2010. En outre, le nombre de cas de diabète augmente sans cesse et la maladie se déclare à un âge de plus en plus jeune ce qui laisse croire que des facteurs environnementaux sont impliqués dans l'induction de la pathologie (Vehik et Dabelea, 2011; Ziegler *et al.*, 2011). Plusieurs infections virales peuvent agir comme élément déclencheur de la maladie, par exemple des entérovirus tels que le coxsackievirus. Ces derniers peuvent induire la pathologie par mimétisme moléculaire. Les protéines virales sont la cible de la réponse immunitaire, les peptides dérivés de ces protéines ont une forte ressemblance aux protéines du pancréas, ce qui entraîne la destruction de ce dernier (Hiemstra *et al.*, 2001; Horwitz *et al.*, 1998; Wen *et al.*, 2004).

Plusieurs composantes génétiques prédisposent un individu au DT1 : notons particulièrement les molécules HLA II (DR3/DR4 et DQ2/DQ8) (Erlich *et al.*, 2013; Sugihara *et al.*, 2012). Chez l'homme, ces molécules favoriseraient la présentation de certains épitopes protéiques provenant du pancréas, ce qui déclenche la réponse immunitaire. De plus, plusieurs gènes impliqués à différents niveaux dans la réponse immunitaire sont aussi associés à la maladie, tels que ceux encodant l'IL-2, le CD25, le CTLA-4 et la PTPN22 (Todd *et al.* 2007).

1.7 Modèles d'études

Deux modèles animaux, le rat BB et la souris NOD, développent spontanément le diabète de type 1. Les premières colonies de rats BB ont été établies au Canada dans les années 70. Ces rats développent de façon spontanée le diabète de type 1 et souffrent de lymphopénie (Yang *et*

Santamaria, 2006). La souris NOD (non obèse diabétique) est le modèle le plus utilisé, car il présente plusieurs avantages (manipulations, modèles transgéniques et autres). Ce modèle développe de façon spontanée un diabète qui ressemble à celui retrouvé chez l'homme (Atkinson et Leiter, 1999; Hanafusa *et al.*, 1994). On retrouve plusieurs loci communs de susceptibilité entre les hommes prédisposés à la maladie et la souris NOD. Ce modèle animal a été découvert en 1974 par hasard par les chercheurs japonais du « Shionogi Research Laboratories » d'Osaka (Hanafusa *et al.*, 1994) qui voulaient développer un modèle d'étude pour les cataractes sur un fond génétique de souris « Swiss » (Jcl-ICR) (Solomon et Sarvetnick, 2004). Le développement du diabète de type 1 chez la souris NOD est influencé par l'environnement, puisque ces souris doivent être gardées dans un environnement sans pathogène afin de développer la pathologie (Todd, 1991).

1.8 Développement du DT1

Le développement du DT1 est divisé en deux phases, la phase d'initiation et la phase de progression, illustrées dans la figure 2. Durant la phase d'initiation, les cellules infiltrent les pourtours des îlots et causent ce qu'on appelle la péri-insulite, qui est suivie d'une destruction progressive des cellules bêta du pancréas. (Fujino-Kurihara *et al.*, 1985). Aucun symptôme clinique n'est observé à ce stade. Chez la souris NOD, la péri-insulite est détectée chez les mâles et les femelles dès l'âge de deux à trois semaines. Parmi les cellules impliquées dans la péri-insulite, on retrouve les cellules présentatrices d'antigènes (APC) comme les macrophages et les cellules dendritiques (Mathis *et al.*, 2001). Les APCs phagocytent les cellules bêta mortes par apoptose. Cette apoptose est normale et peut être causée par trois phénomènes, soit par le remodelage des îlots, observé vers l'âge de deux semaines, le changement alimentaire qui survient au sevrage (trois semaines), ou à cause d'une infection virale (Turley *et al.*, 2003; von Herrath *et al.*, 2003). Les APCs présentent ensuite les antigènes aux lymphocytes T autoréactifs et causent leur activation. Plus tard, les lymphocytes T CD4⁺, T CD8⁺, les lymphocytes B (Jansen *et al.*, 1994) et parfois des cellules « Natural Killer » (NK) sont retrouvés dans la péri-insulite (Miyazaki *et al.*, 1985). La phase d'initiation est ensuite suivie de la phase de progression. Cette phase s'effectue lentement et peut être observée jusqu'à l'âge d'environ 12 à 14 semaines chez la souris NOD. Dès l'âge de 14 semaines, l'insulite non destructrice progresse vers une insulite

agressive menant à la destruction des cellules bêta du pancréas. Une cascade s'enclenche, car les lymphocytes T autoréactifs migrent vers les îlots et détruisent les cellules bêta. Les débris sont ensuite phagocytés par les cellules présentatrices d'antigène qui retournent aux ganglions pour activer d'autres lymphocytes T autoréactifs. L'hyperglycémie, un des symptômes importants du DT1, est observée lorsque 90 % des cellules bêta sont détruites. À l'âge de 30 semaines, 80 % des souris femelles et environ 20 % des souris mâles ont développé le DT1 (Solomon et Sarvetnick, 2004).

L'importance des diverses populations leucocytaires dans le développement du diabète de type 1 chez la souris NOD a fait l'objet de plusieurs études qui seront décrites dans les sections suivantes.

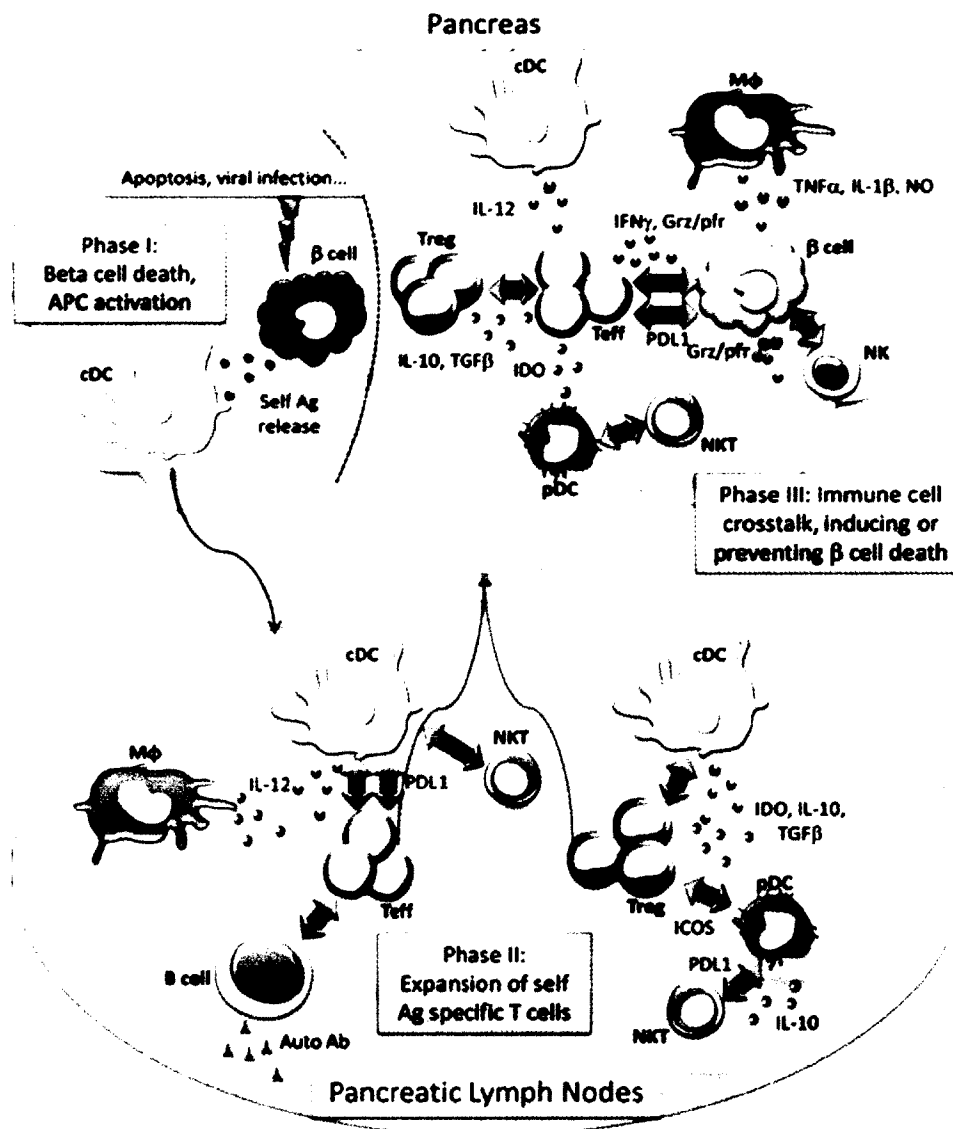


Figure 2. Cascades d'évènements menant au développement du diabète de type 1

Représentation schématique du développement du diabète de type 1 ainsi que les principales cellules immunitaires impliquées dans le développement de la maladie. La phase 1 est caractérisée par l'apoptose des cellules bêta et la phagocytose de ces cellules par les DCs. Les DCs migrent ensuite aux ganglions lymphatiques et présentent les auto-antigènes aux lymphocytes T autoréactifs. Par la suite, les lymphocytes T retournent au pancréas pour détruire les cellules bêta, qui encore une fois, seront phagocytées par les DCs et les autres APC. Extrait de (Diana *et al.*, 2011).

1.9 Les DCs et le diabète de type 1

Les premières études impliquant les DCs dans le développement du diabète datent de la fin des années 70. En 1979, le groupe de Lacy a remarqué la présence de cellules myéloïdes dans le greffon d'îlots pancréatiques (Lacy *et al.*, 1979) et a montré que la déplétion de ces cellules augmentait la survie du greffon. Ultérieurement, il a été rapporté que les DCs et les macrophages sont parmi les premières cellules à infiltrer les îlots de Langerhans (Mathis *et al.*, 2001). De plus, de nombreuses études montrent que les DCs de souris NOD mûrissent plus que les DCs d'autres souches de souris en réponse à de nombreux stimuli (Dahlen *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Pearson *et al.*, 2003; Strid *et al.*, 2001). Elles expriment des quantités plus élevées des molécules de costimulation et des molécules de CMH II à leur surface. De plus, elles produisent davantage d'IL-12 que les DCs isolées d'autres souches de souris résistantes au diabète (Poligone *et al.*, 2002; Steptoe *et al.*, 2002). Les souris NOD possèdent un haplotype spécifique du CMH de classe II, I-A^{g7}, qui favorise la présentation de plusieurs auto-antigènes (Ridgway et Fathman, 1999). Cette molécule est essentielle au développement de la pathologie, puisqu'une seule mutation dans cette protéine protège la souris NOD contre le développement de la maladie (Wicker *et al.*, 1987).

Plusieurs groupes ont étudié les cellules dendritiques générées à partir de la moelle osseuse de souris NOD. Tout d'abord, les travaux de Feili-Hariri et Morel ont démontré que les cellules de la moelle osseuse de souris NOD cultivées *in vitro* en présence de GM-CSF et d'IL-4 sont dans un état de maturation plus avancé que les DCs de souris non susceptibles au développement du diabète de type 1 (Feili-Hariri et Morel, 2001). Ce même groupe affirme que les DCs ainsi générées protègent contre le DT1 (Feili-Hariri *et al.*, 1999; Taieb *et al.*, 2007). De plus, un nombre inférieur de DCs est obtenu lors de la culture de la moelle osseuse de souris NOD comparativement à d'autres souches de souris (C57BL/6 et BALB/c) (Nikolic *et al.*, 2004). Le faible nombre de DCs obtenu chez la souris NOD expliquerait la faible capacité des DCs à induire une tolérance périphérique (Feili-Hariri et Morel, 2001). Les DCs de souris NOD ont également un taux d'apoptose plus élevé comparativement aux souris NOR (non obèse résistante, souris congéniques aux NOD mais qui ne développent pas le diabète de type 1) (Nikolic *et al.*, 2004). Une étude a révélé que chez les souris NOD, il y a un dérèglement dans la différenciation

des cellules de la moelle osseuse en DCs et qu'il y a génération préférentielle de macrophages *in vitro* (Nikolic *et al.*, 2004). Le même groupe a montré que les monocytes de souris NOD se différencient préférentiellement en macrophages *in vivo* et non en DCs (Nikolic *et al.*, 2005).

Les DCs conventionnelles peuvent aussi avoir un effet protecteur contre le DT1. En effet, des études ont démontré que les DCs peuvent induire l'anergie, la délétion clonale ainsi que l'expansion des Tregs (Ueno *et al.*, 2007). Plusieurs études ont montré que des traitements au G-CSF (Kared *et al.*, 2005), au GM-CSF (Gaudreau *et al.*, 2007) et à la TSLP (Besin *et al.*, 2008) favorisent l'expansion de DCs tolérogènes qui protègent contre la pathologie.

Les DCs plasmacytoïdes semblent aussi être impliquées dans la pathologie. Chez l'humain et la souris, il y a une importante production d'IFN de type 1 au niveau du pancréas ce qui pourrait induire et promouvoir le développement de la maladie (Huang *et al.*, 1995; Stewart *et al.*, 1993). Il y a une augmentation du nombre de DCs plasmacytoïdes produisant de l'IFN de type 1 au niveau du pancréas lors de la phase d'initiation du diabète (Li *et al.*, 2008). La déplétion des pDCs chez la souris NOD par l'administration d'un anticorps spécifique (dirigé contre le mPDCA1) entre l'âge de 15 et 25 jours retarde significativement le développement du DT1 et réduit l'incidence de la maladie (Li et McDevitt, 2011). Chez la souris NOD, il y a aussi un plus grand nombre et une plus grande proportion de pDCs dans la rate comparativement à d'autres souches de souris (C57BL/6, BALB/c) (Pelletier *et al.*, 2012). Cependant, un nombre et une proportion similaires de pDCs sont retrouvés chez la souris NOR, ce qui laisse planer un doute quant à leur implication dans le développement de l'insulite et du diabète (Pelletier *et al.*, 2012).

1.10 Les lymphocytes T et le diabète de type 1

Plusieurs études ont clairement montré l'implication des lymphocytes T dans le développement du DT1. Par exemple, il a été démontré que la déplétion des lymphocytes T par l'injection à des souris NOD d'un anticorps anti-CD3, une molécule exprimée par tous les lymphocytes T, prévient le développement du diabète (Hayward et Shreiber, 1989). De plus, il a été démontré que les deux principaux types de lymphocytes T, soient les CD4⁺ et les CD8⁺, sont essentiels au

transfert de la pathologie chez de jeunes souris NOD (moins de 3 semaines) (Bendelac *et al.*, 1987).

1.10.1 Les lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ participent activement au développement du diabète de type 1. Les lymphocytes T CD4⁺ sont impliqués, au niveau des organes lymphoïdes, dans l'activation des lymphocytes T CD8⁺ qui pourront ensuite retourner au niveau des îlots et avoir une activité cytotoxique envers les cellules bêta (Solomon et Sarvetnick, 2004). En conséquence, des souris NOD déplétées en lymphocytes T CD4⁺ par l'utilisation d'anticorps bloquant sont protégées contre le développement du diabète (Shizuru et Fathman, 1993). On sait que les lymphocytes T naïfs ont la capacité de se différencier en Th1, Th2, Th17 et Tregs, qui seront introduits dans les sections suivantes. Les Tregs en particulier ont été impliqués dans le développement ou la protection contre le DT1. La figure 3 montre que la nature des cytokines produites (3^e signal d'activation) par les cellules présentatrices d'antigènes est importante pour déterminer le type de lymphocytes T qui sera généré.

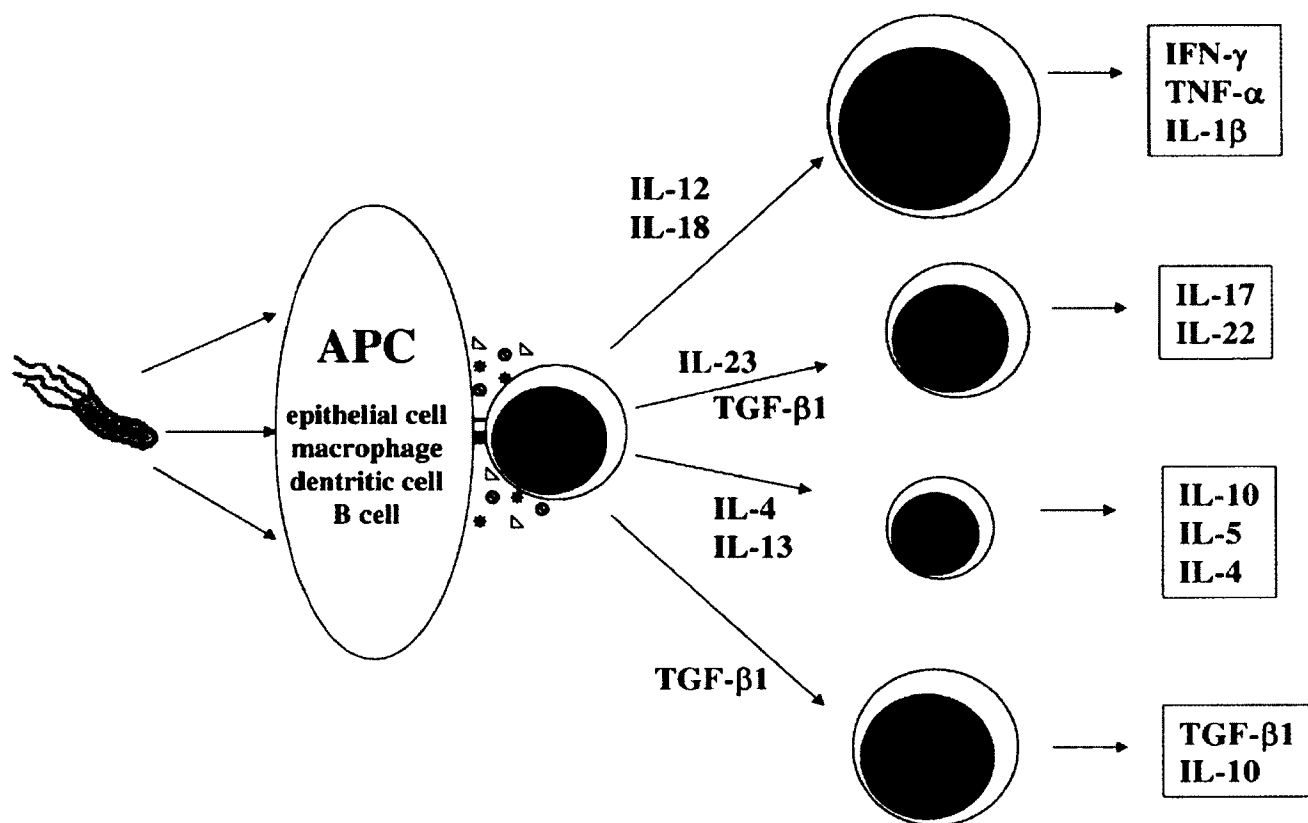


Figure 3. Implication des cytokines dans la détermination du type de lymphocytes T CD4⁺.

Un lymphocyte T CD4⁺ naïf peut se différencier en lymphocyte Th1 s'il y a présence d'IL-12 lors de son activation. Par contre, s'il y a présence d'IL-4 et d'IL-13, le lymphocyte T CD4⁺ naïf deviendra plutôt un lymphocyte Th2. Si de l'IL-23 est présente lors de l'activation, il y aura différenciation en lymphocyte Th17 tandis que la présence de TGF- β 1 induit la génération de Tregs. Adapté de (Kandulski *et al.*, 2010).

1.10.1.1 Les lymphocytes T CD4⁺ de type Th1

Les lymphocytes CD4⁺ de type Th1 sont des cellules caractérisées par leur production de cytokines telle que l'IFN- γ , et ce profil est induit par des APC produisant de l'IL-12. De plus, les Th1 expriment le facteur de transcription T-bet, responsable de l'induction de gènes spécifiques au Th1. T-bet recrute et interagit physiquement avec plusieurs agents de remodelage de la chromatine ce qui augmente l'accessibilité des gènes caractéristiques des Th1 (production d'IFN- γ , IL-2) et qui permet la liaison d'autres facteurs de transcription sur la chromatine dont NFAT1, Runx3, STAT4 et NF- κ B (Avni *et al.*, 2002; Djuretic *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2004; Sica *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 2010). T-bet peut aussi inhiber la conversion des lymphocytes T naïfs en Th2 en interagissant physiquement avec GATA-3, le facteur de transcription « spécifique » des Th2, ce qui empêche GATA-3 de se lier aux promoteurs de gènes spécifiquement exprimés par les Th2 (Hwang *et al.*, 2005).

Les lymphocytes Th1 jouent un rôle clé dans le diabète de type 1, car ils produisent des concentrations importantes d'IFN- γ . De plus, la neutralisation de l'IFN- γ permet de protéger contre le DT1 (Debray-Sachs *et al.*, 1991). Cependant, les souris NOD déficientes en IFN- γ développent tout de même le diabète, ce qui laisse croire que ce dernier joue un rôle important, mais pas essentiel pour développement de cette pathologie (Hultgren *et al.*, 1996). Les APC qui produisent de l'IL-12 induisent la conversion des lymphocytes T naïfs en Th1. Il a été démontré (Trembleau *et al.*, 1995) que l'administration d'IL-12 accélère le développement de DT1 chez les souris NOD et que cela corrèle avec une augmentation de la production de cytokines de type Th1. Un autre groupe a démontré que l'ablation du gène *tbx21* (qui code pour la protéine T-bet) protège la souris NOD contre l'insulite et le DT1 (Esensten *et al.*, 2009).

Plusieurs modèles de souris transgéniques ont facilité l'étude du rôle des lymphocytes T dans le DT1, par exemple les souris ayant un TCR spécifique pour un antigène dérivé du pancréas. Les souris transgéniques ayant un TCR qui reconnaît spécifiquement le peptide BDC2.5 (NOD.BDC2.5) ont été très étudiées (You *et al.*, 2003). Ce peptide présenté par le CMH de classe II est dérivé de la chromogranine A (Nikoopour *et al.*, 2011). Les lymphocytes T CD4⁺ des souris

transgéniques peuvent également être stimulés par un grand nombre de peptides mimotopes *in vitro* (Judkowski *et al.*, 2001). Ces lymphocytes sont très diabétogènes lorsque transférés à des souris NOD.SCID ou des souris NOD.RAG^{-/-}. Ainsi, la souris transgénique BDC2.5 est un modèle très utile pour l'étude des lymphocytes T CD4⁺ dans le diabète auto-immun.

1.10.1.2 Les lymphocytes CD4⁺ de type Th17

Les lymphocytes Th17 ont été découverts à cause de leur implication dans des maladies auto-immunes. Avant leur découverte, on croyait que les lymphocytes Th1 étaient responsables de certaines maladies auto-immunes comme l'EAE et le diabète de type 1. Pourtant, La génération de souris déficientes en IFN- γ , en récepteur de l'IFN- γ , en IL-12p35 et en IL-12R β 2, n'a pas permis de protéger les souris contre l'EAE (Gran *et al.*, 2002; Gutcher *et al.*, 2006; Krakowski et Owens, 1996; Tran *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003a; Zhang *et al.*, 2003b). Ces études ont donc démontré que d'autres cellules étaient responsables du développement de cette pathologie. En 2000, la molécule IL-23p19 a été découverte (Oppmann *et al.*, 2000). Cette protéine dimérise avec l'IL-12p40 pour former l'IL-23. Une étude comparative entre les souris KO pour l'IL-12p35 et l'IL-23p19 a montré que l'IL-23p19 est essentielle pour le développement de l'EAE contrairement à l'IL-12p35 (Langrish *et al.*, 2005). Cette étude a aussi permis de démontrer que l'IL-23 permet d'accroître et de générer des Th17 pouvant transférer la pathologie lorsque ceux-ci sont injectés à des souris C57BL/6.

L'IL-23 est aussi impliquée dans la production d'IL-17 par les lymphocytes T activés (Aggarwal *et al.*, 2003). Le récepteur de l'IL-23 n'est pas exprimé par les lymphocytes T naïfs, mais est induit par ROR γ t. L'IL-23 est impliquée dans la stabilisation des lymphocytes T se différenciant en Th17 (Zhou *et al.*, 2007). Cependant, l'IL-23 est indispensable au maintien des Th17 car les souris déficientes en IL-23p19 n'ont presque pas de Th17 (Korn *et al.*, 2009). Contrairement à l'IL-23, la production d'IL-21 est indépendante de ROR γ t mais plutôt dépendante de STAT3 (Zhou *et al.*, 2007). Plusieurs études ont montré que les lymphocytes T naïfs ont besoin de TGF- β et d'IL-6 pour être convertis en Th17 (Benwell et Lee, 2010). Le TGF- β est aussi essentiel pour la différenciation des lymphocytes T naïfs en Tregs (Tran, 2012). De plus, des études ont montré que l'IL-21 et le TGF- β sont capables de différencier les lymphocytes T naïfs en Th17. Des

études ont montré dans un modèle de EAE que la polarisation *in vitro* des Th17 avec de l'IL-23 de l'IL-1 β et de l'IL-6 induit des Th17 pathogéniques (Ghoreschi *et al.*, 2010) alors que la polarisation des lymphocytes T en présence de TGF- β , IL-6 et IL-1 β induit des Th17 qui ne sont pas capables d'induire la pathologie (McGeachy *et al.*, 2007). De plus, les Th17 convertis en présence de TGF- β et d'IL-6 ont une expression plus élevée des gènes de ROR γ T et d'IL-17 et peuvent aussi produire de l'IL-10 qui pourrait avoir des effets tolérogènes (McGeachy *et al.*, 2007).

Divers facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation des Th17. Les combinaisons TGF- β /IL-6 et TGF- β /IL-21 sont capables d'induire l'expression de ROR γ T, le facteur de transcription caractéristique des Th17. ROR γ T est essentiel pour les Th17, puisque les souris reconstituées avec de la moelle osseuse de souris déficiente en ROR γ T n'ont pas de Th17 (Ivanov *et al.*, 2006). Un autre facteur de transcription similaire à ROR γ T est exprimé spécifiquement chez les Th17 : il s'agit de ROR α . ROR α pourrait remplacer ROR γ T dans la différenciation des Th17 (Yang *et al.*, 2008). Un autre facteur de transcription important pour la différenciation des Th17 est STAT3. Des souris ayant une déficience en STAT3 au niveau des lymphocytes T ont un nombre réduit de Th17, tandis que la surexpression d'une forme constitutivement active de STAT3 induit une augmentation dans le nombre de Th17 (Harris *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007). STAT3 pourrait augmenter l'expression des facteurs de transcription ROR γ T et ROR α et induire la production d'IL-17 (Yang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008). STAT3 pourrait aussi avoir un effet direct sur la production d'IL-17 et d'IL-21 puisque STAT3 se lie directement à leurs promoteurs (Chen *et al.*, 2006a; Wei *et al.*, 2007). Une autre étude a aussi montré que la déficience en IRF-4 conduit à un déficit en Th17 et induit une protection contre l'EAE (Biswas *et al.*, 2010; Brustle *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Huber *et al.*, 2008; Huber *et al.*, 2013). Cependant, une surexpression de ROR γ T chez ces souris permettait de rétablir la production d'IL-17 et donc la pathologie (Huber *et al.*, 2008). Ces résultats démontrent aussi l'importance d'IRF-4 ou de ces voies de signalisation dans la différenciation des Th17. Il y a donc plusieurs facteurs de transcription qui régulent l'expression des gènes caractéristiques des Th17.

Un des loci de susceptibilité au diabète de type 1, soit le *idd3*, comprend le gène qui code pour l'IL-21 (Spolski *et al.*, 2008). Des études ont démontré que chez la souris NOD il y a une production plus importante d'IL-21 ainsi que de son récepteur comparativement à d'autres souches de souris (King *et al.*, 2004; McGuire *et al.*, 2009). Les souris NOD congéniques pour le locus *idd3* de souris C57BL/6 (*idd3^{bb}*) ne présentent pas cette augmentation d'IL-21 ni de son récepteur (King *et al.*, 2004). De plus, plusieurs équipes ont montré que cette cytokine est essentielle au développement du diabète (Liu *et al.*, 2011; McGuire *et al.*, 2011; Van Belle *et al.*, 2012). Plusieurs études ont été réalisées avec des Th17 chez la souris NOD. En effet, l'injection des Th17 à des souris NOD-SCID induit le diabète. Cependant, ces études montrent que les Th17 générés *ex vivo* peuvent, une fois injectés, se convertir en Th1 (Bending *et al.*, 2009; Martin-Orozco *et al.*, 2009). L'implication des Th17 dans le développement du DT1 est donc encore controversée en raison de leur capacité à se convertir en Th1.

De façon intéressante, chez les patients atteints du DT1, on remarque aussi une diminution des Tregs et une augmentation des Th17 dans les ganglions pancréatiques et dans le sang périphérique (Ferraro *et al.*, 2011). Cette étude tend à démontrer l'importance des Th17 dans la pathologie humaine et vient appuyer les résultats obtenus dans les modèles animaux.

1.10.1.3 Les lymphocytes T régulateurs (Tregs)

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) expriment à leur surface les molécules CD62L, CD45RB^{low}, GITR^{+/high}, LAG-3, LAP/TGF- β ⁺ et CTLA-4⁺ (Chen, 2006). Ces derniers marqueurs ne sont pas seulement exprimés sur les lymphocytes T régulateurs, mais aussi sur les lymphocytes T CD4⁺ activés via leur TCR (Chen, 2006). Les Tregs sont caractérisés par l'expression des molécules CD4⁺, CD25⁺ et du facteur de transcription FoxP3 (Chen, 2006). Il existe deux types de lymphocytes T régulateurs, soient les Tregs « naturally occurring » (nTregs) et les Tregs induits (iTregs) (Lan *et al.*, 2005).

Les nTregs se développent dans le thymus et migrent ensuite en périphérie et dans les organes lymphatiques secondaires (Lan *et al.*, 2005). Ce type de Tregs est le plus étudié en vue d'une possible thérapie cellulaire (Bluestone et Abbas, 2003). Dans le sang de patients atteints du

diabète de type 1, une étude a démontré qu'il y a une diminution importante des lymphocytes Tregs, identifiés par l'expression des molécules CD4 et CD25 (Kukreja *et al.*, 2002). Cependant, une autre étude a montré grâce à l'utilisation du marqueur Foxp3 que les patients atteints de DT1 ont un nombre et une distribution de Tregs semblables aux sujets sains, mais que leur capacité suppressive serait inférieure (Brusko *et al.*, 2007; Brusko *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2010). De plus, d'autres études ont démontré que ce sont plutôt les lymphocytes T effecteurs de patients atteints de DT1 qui sont résistants à l'activité suppressive exercée par les nTregs (Lawson *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2008). Les nTregs ont absolument besoin d'IL-2 pour effectuer leurs fonctions suppressives. Des études génétiques ont montré l'existence d'un défaut dans la voie de signalisation de l'IL-2 tant chez la souris que chez l'homme atteint de la maladie (Dendrou et Wicker, 2008; Wicker *et al.*, 2005). Ce défaut pourrait expliquer que l'on retrouve moins d'IL-2 chez la souris NOD, et par le fait même, expliquer que l'on remarque une baisse importante des nTregs (Zhou *et al.*, 2009). L'administration d'IL-2 à la souris NOD peut corriger le défaut fonctionnel des nTregs (Tang *et al.*, 2008). Les patients atteints de diabète ont une importante proportion de nTregs qui produisent de l'IFN- γ , une cytokine de type Th1 importante pour le développement de la maladie (McClymont *et al.*, 2011).

Les lymphocytes iTregs sont issus de la différenciation des lymphocytes T naïfs en présence de molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou le TGF- β (Lan *et al.*, 2005), de vitamine D3 (Bang *et al.*, 2012) ou par contact avec des DCs tolérogènes (Maldonado et von Andrian, 2010; Rutella *et al.*, 2006b) ou par une faible stimulation de leur TCR (Bresson *et al.*, 2006; Kretschmer *et al.*, 2006a; Kretschmer *et al.*, 2006b). De plus, les iTregs peuvent être induites par une stimulation de leur TCR en présence d'IL-2 et de TGF- β (Chen *et al.*, 2003; Davidson *et al.*, 2007; Fantini *et al.*, 2004). Le TGF- β induit l'expression de Foxp3 via l'activation de Smad3 (Tone *et al.*, 2008) chez les iTregs. Ces iTregs sont un peu moins étudiées *in vivo*, car elles sont souvent indifférenciables phénotypiquement des nTregs. Même si certaines études montrent qu'il n'y a pas de génération de iTregs dirigés contre les antigènes pancréatiques au cours de la maladie (Wong *et al.*, 2007), ces cellules semblent jouer un rôle important dans la régulation de la réponse auto-immune.

Les lymphocytes T régulateurs (iTregs et nTregs) ont la capacité d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ lorsque ces derniers sont activés de manière spécifique par un peptide (Chen, 2006). Un mécanisme par lequel les Tregs inhibent la prolifération des lymphocytes T a été découvert chez la souris NOD. En effet, le groupe de Tang (Tang *et al.*, 2006) a démontré chez les souris NOD que dans les ganglions lymphatiques pancréatiques et dans la rate, les Tregs entourent les cellules dendritiques empêchant ainsi la présentation d'antigènes aux lymphocytes T. D'autres études ont montré que la suppression de la prolifération des lymphocytes T peut être médiée par les molécules CTLA-4 (Chen, 2006), GITR (Shimizu *et al.*, 2002), PD-1 (Kasagi *et al.*, 2011; Zdrenghea et Johnston, 2012) ou TGF- β . Le TGF- β seul est indispensable à l'immunosuppression (Chen, 2006). Les Tregs expriment également une forme membranaire du TGF- β (LAP-TGF- β), ainsi que le récepteur II du TGF- β (T β RII) qui sont importants dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T naïfs après une stimulation via le TCR (McHugh *et al.*, 2002).

1.10.2 Les lymphocytes T CD8⁺

Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (appelé aussi CD8 diabétoènes) sont impliqués dans la destruction des cellules bêta du pancréas (Serreze *et al.*, 1994; Shizuru *et al.*, 1988). Il a été démontré que les lymphocytes T CD8⁺ détruisent les cellules des îlots via la voie Fas/FasL (Amrani *et al.*, 1999; Nagata *et al.*, 1994).

Une lignée de souris NOD exprimant un TCR spécifique pour l'IGRP (*islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit related protein*) que l'on appelle 8.3-NOD a été générée et développe de façon précoce le diabète de type 1 (Amrani *et al.*, 2000). Il a été démontré que des lignées cellulaires ou des clones de lymphocytes T CD8⁺ réactifs contre des antigènes des îlots de pancréas sont hautement diabétoènes lorsque transférés chez des souris immunodéficientes (NOD-SCID) (Wong *et al.*, 1995) .

Il a aussi été démontré que la spécificité du TCR est très importante. Les auteurs d'une étude ont injecté des lymphocytes T CD8⁺ de souris 8.3-NOD et ont mesuré le degré d'infiltration

lymphocytaire dans le pancréas. Si le peptide de l'IGRP était muté (seulement 2 résidus), il n'y avait plus d'infiltration, et ce, que les lymphocytes soient activés ou non (Wang *et al.*, 2010).

Des études ont montré que les souris NOD déficientes en $\beta 2$ -microglobuline (B2m-null), qui n'expriment pas de CMH de classe I et donc déficientes en lymphocytes T CD8⁺, ne développent pas l'insulite ni le diabète (Katz *et al.*, 1993). De plus, après un transfert de splénocytes isolés de souris diabétiques, ces souris développent le diabète moins rapidement que les souris NOD (Katz *et al.*, 1993; Serreze *et al.*, 1997). D'autres études ont montré que des souris NOD injectées avec un anticorps bloquant dirigé contre la molécule CD8 sont protégées contre le développement du DT1 (Katz *et al.*, 1993). Toutes ces études démontrent l'importance des lymphocytes T CD8⁺ dans le développement de la pathologie.

1.10.3 Les lymphocytes B

Plusieurs groupes de recherche soutiennent que le diabète de type 1 est une maladie qui est médiée par les lymphocytes T mais il ne faut pas négliger l'apport de lymphocytes B dans cette pathologie, car ces derniers sont aussi des APC. Les lymphocytes B peuvent présenter des auto-antigènes, comme la GAD (glutamic acid decarboxylase) (Falcone *et al.*, 1998; Serreze *et al.*, 1998), qui sont produits par les cellules bêta du pancréas.

Une autre fonction des lymphocytes B est la production d'auto-anticorps dirigés contre différentes protéines produites par les cellules bêta du pancréas. Chez les patients pré-diabétiques ou nouvellement diagnostiqués, des quantités importantes d'auto-anticorps dirigés contre l'insuline (Palmer *et al.*, 1983), la protéine GAD (Baekkeskov *et al.*, 1990; Baekkeskov *et al.*, 1982) et la protéine tyrosine phosphatase IA2 (insulinoma-associated protein 2)/ICA512 (islet cell antibody 512) (Christie *et al.*, 1994; Hawkes *et al.*, 1996; Solimena *et al.*, 1996) sont retrouvées dans le sang.

Des souris déficientes en chaîne lourde des IgM, donc n'ayant aucun lymphocyte B mature (Kitamura *et al.*, 1991), sont protégées contre le développement du diabète de type 1 (Serreze *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1998). Dans un modèle de souris NOD exprimant le CD20 humain, des

chercheurs ont été capables de dépléter les lymphocytes B *in vivo* en utilisant un anticorps dirigé contre le CD20 humain, soit le Rituximab. Une déplétion temporaire des lymphocytes B permet de retarder la maladie et même de prévenir son développement. De plus, quelques souris diabétiques ont même eu une rémission de la maladie (Hu *et al.*, 2007). La déplétion des lymphocytes B chez les souris NOD.BDC2.5 induit une agressivité des lymphocytes T CD4⁺ et une réduction du nombre de Tregs. Cependant, le retour des lymphocytes B permet un retour à la normale (Xiang *et al.*, 2012). Cette étude, et plusieurs autres, semblent attribuer aux lymphocytes B une caractéristique pro-inflammatoire, mais aussi régulatrice. Les Bregs sont des lymphocytes B qui permettent le recrutement des Tregs et qui, par la suite disparaissent pour laisser les Tregs effectuer leurs fonctions suppressives (Berthelot *et al.*, 2012). De façon intéressante, une interaction fonctionnelle a été observée entre les DCs tolérogènes et les Bregs. En effet, il a été démontré que les DCs tolérogènes pouvaient induire la génération de Bregs. Dans une étude, il a été montré que l'injection de DCs tolérogènes à des patients atteints de DT1 augmentait le nombre de Bregs (Giannoukakis et Trucco, 2012).

1.11 Mécanismes moléculaires impliqués dans les diverses fonctions des DCs

Afin d'induire la maturation des DCs, plusieurs groupes de recherche stimulent les DCs immatures avec du LPS, un dérivé bactérien. Dans cette thèse, nous avons également exposé les DCs immatures à cette molécule. La figure 4 illustre les voies de signalisation activées par la liaison du LPS au TLR4 chez les DCs. L'étude des divers facteurs de transcription dans cette thèse est basée sur leur potentiel d'implication dans la production d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire importante pour le maintien de la tolérance immunitaire. Parmi les protéines ciblées, on retrouve des MAP kinases (mitogen activated protein kinase), des kinases et des facteurs de transcription. Les MAP kinases sont des protéines kinases activées par des MAP kinases kinases (MAPKK) et permettent notamment l'activation de plusieurs facteurs de transcription.

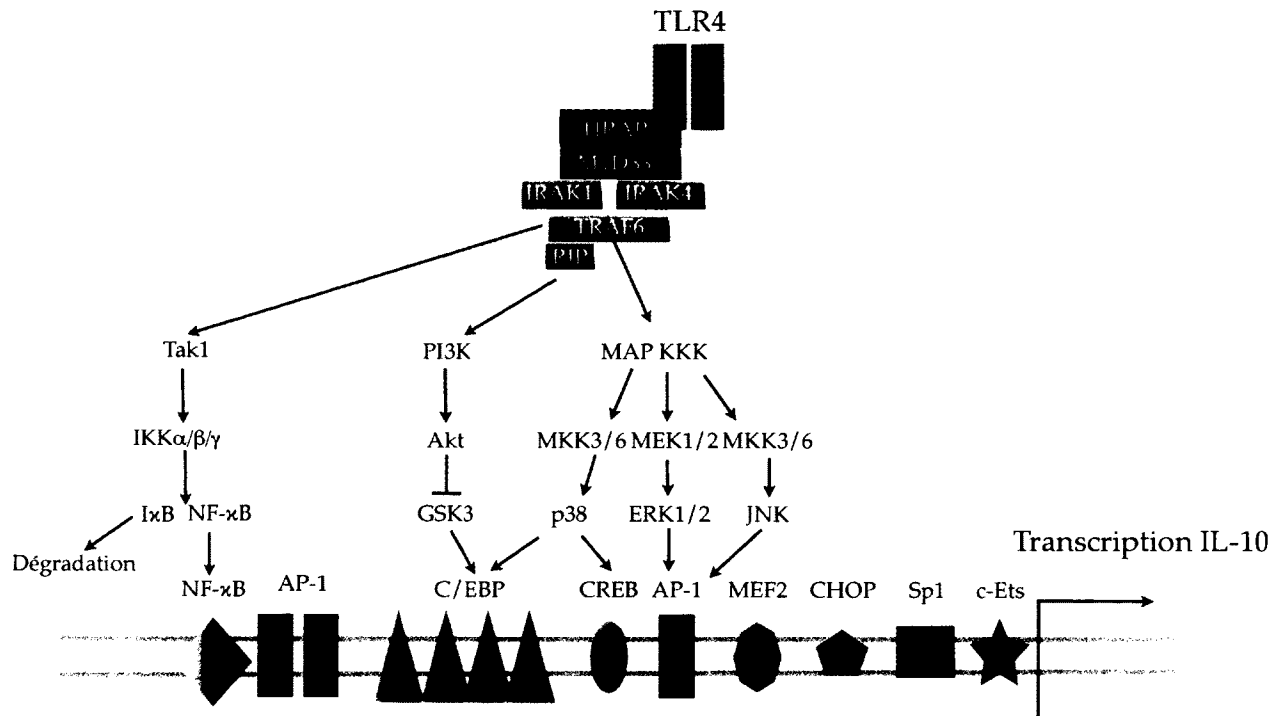


Figure 4. Schématisation des voies de signalisation activées par le TLR4

Cette figure présente les différentes voies de signalisation induites par la liaison du LPS au TLR4 chez les DCs. En parallèle, les divers facteurs de transcription impliqués dans la transcription du promoteur de l'IL-10 sont aussi présentés.

1.11.1 PI3K

Les PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinases) sont une famille d'enzymes possédant une activité protéine kinase et une activité lipide kinase. En effet, la PI3K peut phosphoryler les phosphoinositides en position D3 dans l'anneau inositol (Ghigo *et al.*, 2010). Quatre classes de PI3K existent soient la classe IA, IB, II et III (Thi et Reiner, 2012). Dans l'inflammation, le rôle des PI3K de classes II et III est encore inconnu alors que les rôles des PI3K de classes IA et IB sont mieux connus. La classe IA est formée de trois isoformes, soient la PI3K α , PI3K β et la PI3K δ , qui sont constituées d'une sous-unité catalytique (p110 α , p110 β et p110 δ) ainsi que d'une sous-unité régulatrice (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β , ou p55 γ) (Geering *et al.*, 2007; Ueki *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 1998). La PI3K de classe IB est constituée de la sous-unité catalytique p110 γ qui s'associe avec une des sous-unités régulatrices p101 ou p84 (Maier *et al.*, 1999; Suire *et al.*, 2005; Voigt *et al.*, 2006). Toutes les PI3K de classe 1 phosphorylent le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PI(4,5)P₂] ce qui permet de produire le phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate [PI(3,4,5)P₃], un second messager important dans la transduction du signal. Les souris déficientes en PI3K α et PI3K β ne sont pas viables puisqu'elles meurent à un stade embryonnaire précoce (Bi *et al.*, 2002; Bi *et al.*, 1999). Les souris déficientes en PI3K γ sont viables et présentent des anomalies principalement au niveau de la réponse immunitaire, à savoir une diminution de la migration des neutrophiles et des macrophages en réponse à divers stimuli comme le fMLP et RANTES qui se lient à des récepteurs couplés aux petites protéines G hétérotrimériques (GPCRs) (Hirsch *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000). La PI3K γ est essentielle aux changements morphologiques associés à la polarisation cellulaire ainsi que pour le réarrangement du cytosquelette (Barberis *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2007). La PI3K δ aurait aussi des fonctions similaires chez les neutrophiles et les macrophages (Puri *et al.*, 2004; Sadhu *et al.*, 2003a; Sadhu *et al.*, 2003b). Ces deux protéines ont une activité synergique puisque l'ablation génique des 2 sous-unités (PI3K δ et PI3K γ) diminue de façon plus importante l'adhésion des neutrophiles à la paroi des cellules endothéliales comparativement à l'ablation d'une seule de ces sous-unités (Puri *et al.*, 2005).

Deux études qui démontrent l'implication de la PI3K dans les DCs ont retenu notre attention. Chez les DCs humaines, la PI3K semble être responsable avec la tyrosine kinase Src de l'activation de p38 qui semble, à son tour, activer la sous-unité p65 de NF- κ B et c-Fos, une composante de AP-1 (Pathak *et al.*, 2012). Une récente étude a montré que la production d'IL-10 par des DCs humaines stimulées avec de l'IFN- β était due à l'activation de CREB et de la PI3K (Wang *et al.*, 2011a). En effet, l'IFN- β induit l'activation de la PI3K et de Akt1, ce qui mène à la phosphorylation et à l'inactivation de la GSK3 (Wang *et al.*, 2011a), ce qui a pour conséquence d'augmenter la production d'IL-10 d'une manière dépendante de CREB. De plus, cette étude a démontré que la neutralisation de l'IL-10 ainsi produite permet d'augmenter la production d'IFN- γ et d'IL-17 par des lymphocytes T (Wang *et al.*, 2011a). En somme, ces études illustrent le rôle de la PI3K dans la modulation de la production de cytokines chez les DCs.

1.11.2 GSK3

La GSK3 (glycogène synthase kinase 3) est une enzyme que l'on associe normalement au métabolisme du glycogène, mais aussi à de nombreuses fonctions cellulaires et à de nombreuses maladies. La GSK3 est une enzyme clé dans les voies de signalisation de l'insuline et de Wnt, une protéine notamment impliquée dans l'embryogenèse et l'homéostasie des tissus adultes. La GSK3 peut phosphoryler environ 50 protéines comme, par exemple, la protéine Tau impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Jope *et al.*, 2007). L'activation de la GSK3 est régulée par plusieurs mécanismes. Le premier mécanisme est la phosphorylation de la GSK3 en Ser21 (GSK3 α) ou en Ser9 (GSK3 β). La phosphorylation de ces résidus peut être induite par la voie PI3K/Akt et la voie PKC (Grimes et Jope, 2001b; Woodgett, 1990). La phosphorylation de ces sérines induit un changement conformationnel de la queue N-terminale de la GSK3, ce qui bloque le site de recrutement des substrats et donc l'activité enzymatique de la GSK3. Un autre mécanisme est la modulation de la localisation cellulaire de la GSK3. Une fois les sérines inhibitrices phosphorylées, la GSK3 est séquestrée dans le cytoplasme, ce qui l'empêche d'interagir avec ses substrats qui sont notamment des facteurs de transcription tels que C/EBP, CREB et AP-1 (Bijur et Jope, 2003). Une autre particularité de la GSK3 est que ses substrats doivent être préalablement phosphorylés par une autre kinase. Seulement 4 acides aminés

séparent le site de la première phosphorylation du site de phosphorylation de la GSK3 (Jope *et al.*, 2007). Cette pré-phosphorylation permet le recrutement du substrat et permet « d'aligner » le site de phosphorylation avec le site catalytique de l'enzyme (Cohen et Frame, 2001).

De plus en plus d'études associent la GSK3 à l'inflammation et à diverses maladies. La GSK3 est impliquée dans la production d'IL-6 (Eickholt *et al.*, 2002), d'IL-1 β et de TNF- α par les monocytes en réponse à une stimulation via différents TLRs (Jope *et al.*, 2007). L'activation de la GSK3 diminue fortement la production d'IL-10 alors que son inhibition chez les monocytes induit une augmentation importante de la production d'IL-10 et une diminution importante de la production d'IL-12p40 en réponse à une stimulation au LPS (Martin *et al.*, 2005). Dans cette étude, les auteurs ont aussi montré que la GSK3 régulaient les quantités de la sous-unité p65 de NF- κ B et de CREB dans le noyau ainsi que leur interaction avec le CBP, leur coactivateur. La GSK3 est aussi nécessaire pour une activité transcriptionnelle optimale de NF- κ B (Hoeflich *et al.*, 2000) dans les cellules embryonnaires de souris. L'inhibition de la GSK3 induit une forte liaison à l'ADN du facteur de transcription AP-1 et de CREB en modulant leur niveau de phosphorylation (Gotschel *et al.*, 2008) dans les hépatocytes de souris. La GSK3 peut phosphoryler c-Jun en Thr239, en Ser234 et en Ser249, ce qui inhibe sa liaison à l'ADN et donc son activité transcriptionnelle (Morton *et al.*, 2003; Raivich, 2008). Pour ce qui est de CREB, la GSK3 phosphoryle la Ser129 ce qui diminue sa liaison à l'ADN et son activité transcriptionnelle (Fiol *et al.*, 1994). Un autre substrat de la GSK3 est C/EBP β . La phosphorylation de C/EBP β par la GSK3 induit un changement de sa conformation qui permet sa liaison à l'ADN (Kim *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2005). La GSK3 a une action pro-apoptotique chez les DCs humaines et chez les DCs spléniques de souris (Escribano *et al.*, 2009). De plus, il a été démontré que la GSK3 induit la production d'IL-12 chez les DCs (Ohtani *et al.*, 2008).

Une inhibition de la GSK3 par un agent pharmaceutique (TDZT-8) ou par l'ablation du gène permet de diminuer l'arthrite et la péritonite dans des modèles animaux (Cuzzocrea *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2006). D'autres inhibiteurs de la GSK3 ont été utilisés pour diminuer l'inflammation systémique, la dysfonction rénale et l'hépatotoxicité associée à l'endotoxémie chez le rat (Dugo *et al.*, 2005). Comme la GSK3 est impliquée dans la signalisation de l'insuline, et donc dans la régulation de l'homéostasie du glucose, elle représente une cible thérapeutique potentielle dans le

traitement du diabète et c'est pour cette raison que nous avons décidé d'étudier cette protéine (Eldar-Finkelman, 2002).

1.11.3 ERK1/2

Les MAP kinases ERK peuvent aussi être activées suite à une stimulation au LPS. ERK (extracellular signal-regulated kinase) est une famille de kinases qui comprend plusieurs membres. ERK 1 et 2 sont activées en réponse à des facteurs de croissance et des agents mitogéniques comme l'ester de phorbol (Roux et Blenis, 2004). ERK 1 et 2 ont 83% d'homologie : elles sont exprimées dans la majorité des tissus et sont impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire. Chez les DCs, le LPS induit l'activation de ERK 1 et 2 ce qui promeut leur survie (Rescigno *et al.*, 1998). Une étude a montré qu'une activation prédominante de ERK 1 et 2, comparativement à celle de p38, favorise la production d'IL-10 (Mathur *et al.*, 2004). L'IL-10 permet ensuite l'inhibition de la maturation des cellules dendritiques, l'augmentation de l'expression de CCR7 (Ato *et al.*, 2002) ainsi que l'inhibition de la production d'IL-12 (Loscher *et al.*, 2005). Une étude a montré aussi que l'activation des TLR2 et 4 induisent une synergie ce qui permet d'induire la production d'IL-10 par les DCs quand les cellules sont infectées avec *Trypanosoma cruzi* (Poncini *et al.*, 2010). Lorsque ERK 1 et 2 sont inhibées chez les DCs, il y a augmentation de leur maturation (Puig-Kroger *et al.*, 2001) ainsi que de leur capacité de migration (Luft *et al.*, 2004). Une autre étude a rapporté que l'activation de ERK1 et 2 est requise pour la différenciation des monocytes humains en DCs immatures (Xie *et al.*, 2003). Une étude a aussi démontré que le pré-traitement des DCs avec de la vitamine C induit une forte production d'IL-12 suite à une stimulation au LPS et une inhibition de ERK1/2 augmente cette production d'IL-12 (Jeong *et al.*, 2011).

Une autre étude a démontré que la stimulation de BMDCs avec de l'anti-CD40 cause l'activation de ERK1/2 et de p38 et résulte en une augmentation de l'expression de COX2 et une augmentation de la production de PGE₂, ce qui résulte en une induction d'une réponse de type Th2 et limite le développement d'une réponse de type Th1 (Harizi *et al.*, 2011). Toutes ces études démontrent une implication potentielle de ERK1/2 dans les fonctions tolérogènes des DCs.

1.11.4 p38

La protéine p38 peut être activée suite à une stimulation du TLR4 par ses ligands. La protéine p38, comme son nom l'indique, est une protéine de 38 kDa qui fait partie de la famille des MAP kinases. Plusieurs substrats de p38 sont des protéines kinases nucléaires telles que MSK1/2, MNK et des facteurs de transcription comme CHOP, ELK, NF- κ B et p53 (Dunn *et al.*, 2005). Cette protéine joue un rôle important lors de la maturation des cellules dendritiques. Chez ces dernières, la protéine p38 peut être activée par plusieurs stimuli pro-inflammatoires comme lors de liaison du CD40 à son ligand, d'une exposition au LPS ou au TNF- α (Arrighi *et al.*, 2001; Mathur *et al.*, 2004). L'activation de p38 est requise pour la maturation des DCs (Arrighi *et al.*, 2001; Puig-Kroger *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2004), leur migration (Luft *et al.*, 2004) ainsi que la production d'IL-12 (Luft *et al.*, 2004; Mathur *et al.*, 2004; Puig-Kroger *et al.*, 2001). Plusieurs inhibiteurs pharmacologiques de p38 existent dont le SB 203580. Cet inhibiteur se lie au site catalytique de p38 et bloque son activité kinase. Chez les DCs, lorsque l'activité kinase de p38 est inhibée, leur maturation est fortement diminuée (Luft *et al.*, 2004). Il a été aussi rapporté que l'activation de p38 nuit à la différenciation des monocytes en cellules dendritiques immatures (Xie *et al.*, 2003) et que l'inhibition de p38 favorise la différenciation des monocytes en DCs immatures (Xie *et al.*, 2003).

Le groupe de Chang a voulu déterminer l'effet des MAP kinases sur CIITA (Yao *et al.*, 2006). Dans les BMDC, il a été démontré que la maturation induite par le LPS inhibait l'expression du gène CIITA, un régulateur majeur de l'expression du CMH de classe II. Les auteurs de cette étude montrent que l'inhibition de p38 permet de restaurer l'activation de CIITA inhibée par la maturation induite au LPS. Il a aussi été rapporté que chez les souris déficientes en MKK3, une des kinases responsables de la phosphorylation et donc de l'activation de p38, la production d'IL-12 par les cellules dendritiques était compromise (Lu *et al.*, 1999). La maturation des DCs et la production de cytokines par ces dernières sont régulées de façon indépendante. Cependant, p38 intervient dans les deux phénomènes.

L'activation de p38 a longtemps été associée à un phénotype mature et à des fonctions plutôt immunogènes des DCs. Cependant, Hirata et collègues ont montré que le TNF- α induit la

production d'IL-10 par les DCs via une activation de p38 et de ERK1/2 (Hirata *et al.*, 2011). De plus, chez les humains, les deux MAP kinases ERK1/2 et p38 ont été impliquées dans l'expression de PD-L1 chez les DC humaines et donc dans la tolérance (Wolfle *et al.*, 2011). Cette étude démontre aussi l'implication de p38 dans des fonctions tolérogènes des DCs. Peu d'études associent p38 à des fonctions tolérogènes, elles associent plutôt p38 à la capacité immunogénique des DCs. L'étude de cette protéine chez la souris NOD est aussi intéressante afin de déterminer si cette protéine est impliquée dans la pathologie.

1.11.5 Les STAT

Les protéines STAT sont des facteurs de transcription et font partie d'une famille de protéines impliquées dans la transmission intracellulaire de signaux provenant des récepteurs de cytokines. Une régulation de l'activation des STAT est nécessaire puisque plusieurs réponses physiologiques sont dépendantes de ces protéines, telle que la réponse antivirale, ainsi que le développement de certaines maladies auto-immunes et certains cancers. Il existe 7 membres de la famille des STAT soient STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b et 6 et ces protéines sont activées grâce à leur phosphorylation par les kinases JAK.

STAT4 est exprimée chez les DCs humaines dérivées de monocytes et peut être phosphorylée après stimulation par des ligands activant les récepteurs TLR2 et TLR4, ou par le CD40 ligand ou par des cytokines telles que le TNF- α (Remoli *et al.*, 2007).

Chez les DCs, il a été démontré que STAT5 est activée par le GM-CSF et qu'elle est impliquée dans la différenciation des cellules dendritiques conventionnelles (Welte *et al.*, 1997). L'activation de STAT5 inhibe la différenciation des cellules précurseurs en pDCs. STAT5 inhibe la transcription du facteur de transcription IRF8, qui est important pour la différenciation des CD8 α^+ CD4 $^-$ DCs (Schiavoni *et al.*, 2002). Par opposition au GM-CSF, le FLT3 promeut la différenciation des deux types de DCs, soient les DCs conventionnelles et plasmacytoïdes via l'activation de STAT3 (Laouar *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter que les souris déficientes en STAT3 possèdent des DCs conventionnelles (Laouar *et al.*, 2003).

STAT3 peut être phosphorylée sur la sérine 727 ou tyrosine 705. La phosphorylation de la tyrosine 705 est importante pour la dimérisation des molécules de STAT3, tandis que la phosphorylation en sérine 727 est importante pour maximiser l'efficacité de transcription de STAT3 (Wen et Darnell, 1997; Wen *et al.*, 1995). Plusieurs travaux ont permis de relier STAT3 avec la tolérance immunitaire. Par exemple, des souris ayant une délétion de STAT3 au niveau des macrophages ont une colite sévère causée par un dysfonctionnement de la réponse immunitaire (Takeda *et al.*, 1999). De plus, STAT3 peut être activée par la liaison de l'IL-10 à son récepteur (Niemand *et al.*, 2003). L'activation de STAT3 est aussi impliquée dans l'expression de PD-L1 chez les cellules dendritiques humaines (Wofle *et al.*, 2011). Une forte expression de PD-L1 par les cellules dendritiques permet une protection à long terme contre le diabète de type 1 chez la souris NOD (Gaudreau *et al.*, 2010).

(Tacke *et al.*, 2011)

STAT1 peut être phosphorylée sur les résidus sérine 727 et tyrosine 701. La phosphorylation sur cette tyrosine régule la localisation cellulaire de la protéine et est essentielle à la dimérisation de la protéine (Boisson-Dupuis *et al.*, 2012). La phosphorylation de la sérine, quant à elle, régule l'activité transcriptionnelle en augmentant le recrutement du coactivateur CBP (Pilz *et al.*, 2009). L'activation de STAT1 induit aussi l'expression du facteur de transcription IRF8 (Chen *et al.*, 2011). Nous avons démontré que la protéine IRF-8 était fortement exprimée chez les IL-4/DCs de souris NOD en comparaison avec les GM/DCs de souris NOD et BALB/c (Besin *et al.*, 2011). Contrairement à STAT1, STAT5 a été reconnu comme un inhibiteur de l'expression d'IRF-8 en réprimant sa transcription génique (Esashi *et al.*, 2008).

1.11.6 NF- κ B

NF- κ B est un facteur de transcription impliqué dans la transcription de gènes suite à une activation du TLR 4. Il est un des facteurs de transcription les plus importants de l'inflammation. Il contrôle l'expression de nombreux gènes pro et anti-inflammatoire tant chez l'humain que chez la souris. Ce complexe est formé d'homo- ou d'hétérodimères composés des divers membres de la famille NF- κ B soit p50, p52, RelA (p65), RelB et c-Rel (Xiao *et al.*, 2006). Les protéines p50 et p52 sont générées à partir de précurseurs p105 et p100 respectivement par clivage au niveau de

la partie C-terminale. Le clivage de p105 en p50 est constitutif alors que le clivage de p100 en p52 est inductible (Senftleben *et al.*, 2001).

NF- κ B peut être activé par divers stimuli qui activent des récepteurs TLR et NLR (Bollrath et Greten, 2009). La liaison à ces récepteurs induit l'activation d'une voie de signalisation commune menant à l'activation du complexe IKK (I κ B kinases). Ce complexe est composé de deux protéines catalytiques IKK α et IKK β , et d'une sous unité régulatrice IKK γ aussi appelé NEMO (DiDonato *et al.*, 1997; Mercurio *et al.*, 1997; Regnier *et al.*, 1997). Deux voies d'activation permettent la translocation nucléaire de NF- κ B, soit la voie classique (canonique) et la voie alternative (non-canonique) (présentées à la figure 5) (Xiao *et al.*, 2006). L'activation de la voie canonique est dépendante de l'activité kinase de IKK β et IKK γ qui phosphorylent I κ B α . I κ B α retient le dimère de NF- κ B dans le cytoplasme et lorsqu'elle est phosphorylée, la protéine I κ B α est poly-ubiquitinylée et dégradée par le protéasome 26S, ce qui libère le dimère p65 (Bollrath et Greten, 2009).

La voie non-canonique de NF- κ B est activée plus tardivement que la voie canonique. Elle requiert l'activation d'IKK α (Senftleben *et al.*, 2001). Cette voie nécessite l'activation de la kinase NIK qui permet l'activation et le recrutement de IKK α . Le complexe formé de NIK et de IKK α se lie ensuite au précurseur inactif p100 et le phosphoryle dans les parties C- et N-terminales (Xiao *et al.*, 2004). Le précurseur p100 est ensuite ubiquitinylé et clivé en sa forme active p52 qui transloque alors vers le noyau pour permettre la transcription de gènes (Fong et Sun, 2002; Xiao *et al.*, 2001). La protéine p100 forme un dimère avec RelB, donc une fois p100 clivée, le complexe peut transloquer au noyau. Cette voie d'activation est responsable de la majorité de la translocation nucléaire de RelB (Solan *et al.*, 2002).

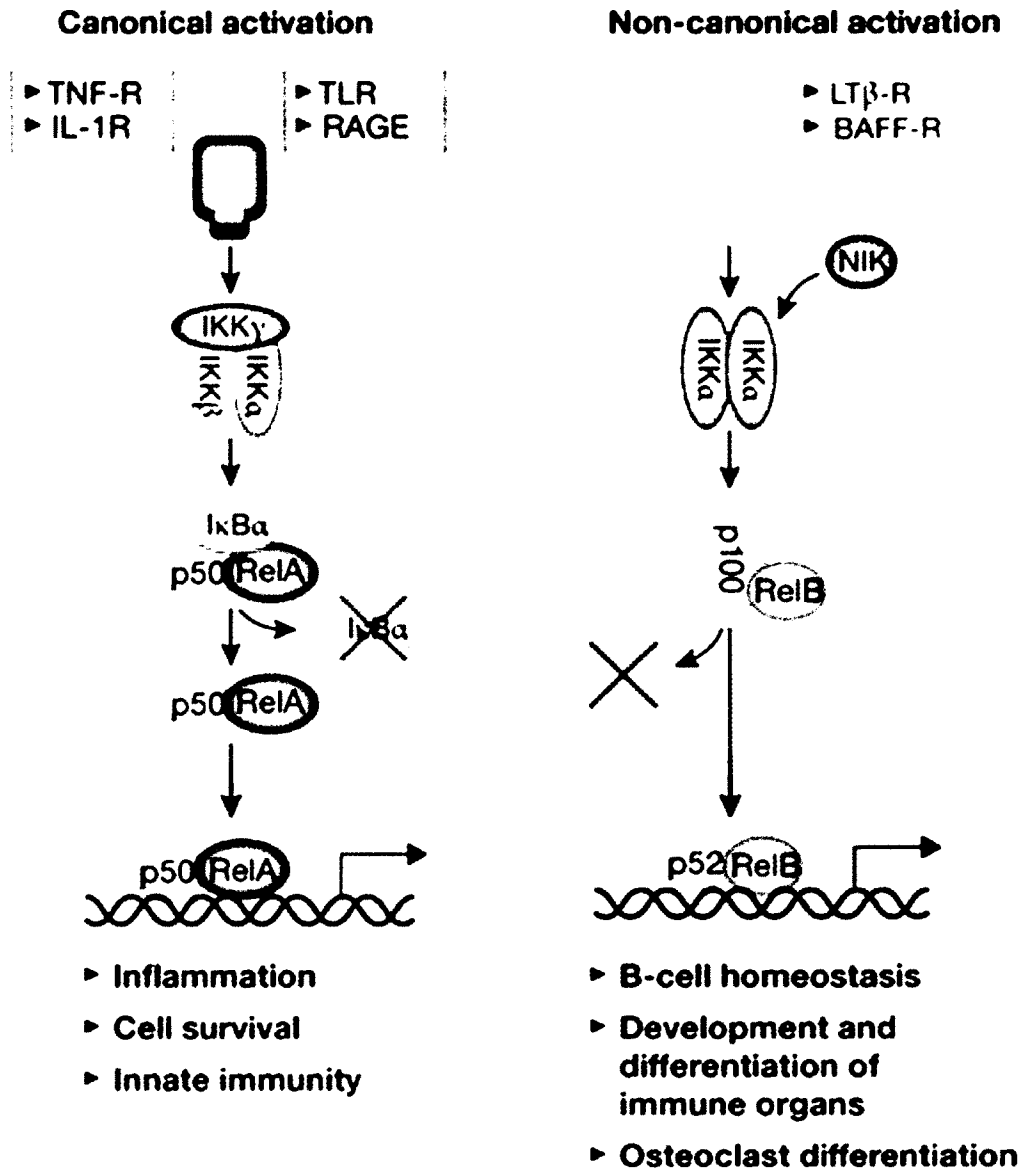


Figure 5. Représentation schématique des deux voies d'activation de NF-κB.

La voie canonique (représentée à gauche sur la figure) représente l'activation rapide de NF-κB suite à un stimulus pro-inflammatoire. Cette voie requiert la dégradation de IκBα qui permet la libération de NF-κB ainsi que sa translocation nucléaire. La voie non-canonique (représentée à droite sur la figure) représente une activation plus tardive de NF-κB suite à un stimulus pro-inflammatoire. Cette voie requiert le clivage du précurseur inactif p100 en sa forme active p52, ce qui permet la translocation nucléaire du complexe NF-κB. Extrait de (Bollrath et Greten, 2009).

Il est bien établi que NF- κ B est essentiel pour l'activation et la maturation des DCs (Rescigno *et al.*, 1998). Une étude a rapporté que la surexpression de I κ B α dans les DCs matures diminue l'expression des molécules de CMH de classe II, des molécules de costimulation CD80 et CD86 et la production de TNF- α (Yoshimura *et al.*, 2001). Un autre groupe a montré qu'une délétion des protéines p50, p52, p65 (RelA) ou c-Rel n'affecte en rien le développement des DCs (Ouaaz *et al.*, 2002). Par contre, les doubles délétions de p50 et RelA ou de p50 et c-Rel affecte le développement des DCs. Ces résultats suggèrent que les sous-unités p50, p52, p65 (RelA) et c-Rel ont des rôles redondants au niveau des DCs et que la délétion d'une sous-unité peut être compensée par une autre. Cependant, aucune sous-unité ne semble être capable de remplacer RelB puisque les souris déficientes en RelB possèdent moins de DCs au niveau de la rate et du thymus (Wu *et al.*, 1998). De plus, les DCs des souris déficientes en RelB ont une faible capacité de présentation d'antigènes et une immunité cellulaire moins efficace que celles des souris de type sauvage (Chen *et al.*, 2002). Une étude a aussi montré que les DCs déficientes en RelB promeuvent la génération de lymphocytes T régulateurs (Martin *et al.*, 2003). L'inhibition de la protéine RelB empêche la différenciation des monocytes en DCs. Cependant la génération et la différenciation des autres types cellulaires d'origine myéloïde ne sont pas affectées par la délétion de RelB (Platzer *et al.*, 2004).

Chez la souris NOD, il a été démontré que les DCs ont un niveau d'activation de NF- κ B élevé, ce qui résulte en une capacité élevée de présentation d'antigènes (Poligone *et al.*, 2002; Weaver *et al.*, 2001). Cette activation anormale de NF- κ B serait due à une forte activité du complexe de kinases IKK (Rescigno *et al.*, 1998). Le groupe de Ma (Ma *et al.*, 2003) a tenté de rétablir un niveau physiologique d'activation de NF- κ B dans les DCs de souris NOD. Pour ce faire, ils ont utilisé une approche d'oligo-transfection avec un oligonucléotide compétiteur contenant la séquence reconnue par NF- κ B. Cette transfection a pour effet d'inhiber la liaison du facteur NF- κ B aux promoteurs endogènes et donc d'empêcher la transcription des gènes activés par NF- κ B. Les DCs transfectées avec l'oligonucléotide étaient moins aptes à présenter des antigènes que les DCs transfectées avec le vecteur vide. De plus, les DCs transfectées avec l'oligonucléotide protègent contre le développement du diabète de type 1, lorsqu'injectées à des souris NOD. Les patients atteints du diabète de type 1 présentent aussi une activation anormale de NF- κ B dans les monocytes et les DCs. Cette activation importante est associée à une expression anormale des

molécules de costimulation (Mollah *et al.*, 2008). Il y a donc une activation importante de NF- κ B chez les DCs de souris NOD ce qui est responsable de leur état de maturation plus important que les DCs provenant d'autres souches de souris.

1.11.7 CREB

L'activation de CREB peut aussi être observée suite à une stimulation du TLR4 et CREB pourrait être impliqué dans la production d'IL-10 par les DCs. La famille du facteur de transcription CREB, comprend le facteur ATF1 (activating transcription factor), le facteur CREM (cyclic AMP response element (CRE) modulator) ainsi que le facteur de transcription CREB (CRE binding protein) (Mayr et Montminy, 2001). Les facteurs de transcription CREB et ATF1 sont exprimés de façon ubiquiste alors que le facteur de transcription CREM est principalement exprimé dans les tissus neuroendocriniens (Mayr et Montminy, 2001). Les messagers encodant pour les facteurs CREB et CREM peuvent subir plusieurs épissages alternatifs générant des isoformes ayant une activité inhibitrice ou activatrice au niveau de la transcription de gènes (Foulkes et Sassone-Corsi, 1992; Long *et al.*, 2001). Comme son nom l'indique, CREB a été découvert lors de l'étude des récepteurs couplés aux protéines G mais l'activation de plusieurs autres récepteurs mène à l'activation de CREB. Lors de l'activation d'un récepteur couplé aux petites protéines G hétérotrimériques, il peut y avoir une activation de l'adénylyl cyclase qui augmente les niveaux d'AMP cyclique dans le cytosol de la cellule (Mayr et Montminy, 2001). Cette accumulation d'AMP cyclique permet l'activation de la protéine kinase A (PKA). Lorsque la cellule n'est pas activée, la PKA est restreinte au cytosol sous forme d'hétérotétramère inactif composé de deux sous-unités régulatrices et de deux sous-unités catalytiques. L'augmentation de l'AMP cyclique permet la libération des sous-unités catalytiques qui migrent passivement au noyau pour induire l'activation de la transcription de gènes via la phosphorylation de CREB (Gonzalez et Montminy, 1989). CREB médie la transcription de gènes en dimérisant puis en se liant sur une séquence conservée TGACGTCA appelée CRE (cAMP-responsive element) (Comb *et al.*, 1986; Montminy *et al.*, 1986; Short *et al.*, 1986). La phosphorylation de CREB sur la Ser133 permet le recrutement du coactivateur transcriptionnel CBP ou p300 (Arias *et al.*, 1994; Chrivia *et al.*, 1993). La GSK3 peut aussi phosphoryler CREB en Ser129, ce qui diminue son

activité transcriptionnelle (Fiol *et al.*, 1994; Gotschel *et al.*, 2008). Une étude a aussi montré que la GSK3 peut aussi phosphoryler CREB en Ser133 et donc moduler sa capacité transcriptionnelle (Gotschel *et al.*, 2008). Des souris ayant une délétion du domaine «basic-leucine zipper» (bZIP) de CREB ont été générées (Rudolph *et al.*, 1998). L'étude de ces souris a révélé qu'elles décédaient à la naissance d'une insuffisance respiratoire (Rudolph *et al.*, 1998). Ces souris ont aussi une déficience dans le développement des lymphocytes T exprimant un TCR de type $\alpha\beta$ au niveau du thymus (Rudolph *et al.*, 1998). Plusieurs études ont porté sur l'implication de CREB dans les fonctions des DCs. Chez l'humain, l'IFN- β induit une forte phosphorylation de CREB et ces niveaux de phosphorylation sont fortement diminués lorsque que la PI3K est inhibée (Wang *et al.*, 2011a). Il est aussi connu qu'outre p38 l'activation de ERK1/2 est aussi capable de mener à la phosphorylation de CREB chez les DC humaines (Jang *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2010). CREB est impliqué dans la production d'IL-10 par les macrophages (Ananieva *et al.*, 2008; Saraiva et O'Garra, 2010) et par les cellules dendritiques humaines (Municio *et al.*, 2011).

1.11.8 C/EBP

Le facteur de transcription C/EBP a été caractérisé pour la première fois dans le laboratoire du Dr. McKnight en tant que protéine résistante à la chaleur retrouvée dans le noyau des hépatocytes de rat (Johnson *et al.*, 1987). Le clonage du gène codant pour C/EBP (Landschulz *et al.*, 1988) et les études ultérieures ont permis de déterminer l'existence d'un domaine «basic-leucine zipper» (bZIP) permettant la liaison à l'ADN ainsi que la dimérisation. Par la suite, d'autres gènes codant pour d'autres protéines de la famille de C/EBP ont été découverts. Actuellement, on dénombre 6 membres de la famille C/EBP (α , β , δ , γ , ϵ , et ζ) qui sont codés par des gènes différents (Ramji et Foka, 2002) (figure 6). Des isoformes de certains membres de la famille C/EBP ont également été rapportés (Ramji et Foka, 2002). Par exemple, un usage alternatif des codons d'initiation de la traduction sur la même molécule d'ARN messager de C/EBP β et de C/EBP α permet de synthétiser des isoformes aux fonctions différentes. C/EBP ϵ possède plusieurs promoteurs et l'usage alternatif de ces différents promoteurs permet la synthèse de différentes isoformes (Lekstrom-Himes, 2001; Yamanaka *et al.*, 1997). Dans le cas de C/EBP β , trois isoformes sont connues: LAP*, une protéine de 38 kDa, LAP, une protéine de 35 kDa et LIP, une protéine de 20

kDa (Descombes et Schibler, 1991). LAP et LIP sont généralement les deux formes les plus exprimées. LAP comprend le domaine d'activation ainsi que le domaine bZIP tandis que LIP ne comprend que le domaine de bZIP. L'absence du domaine d'activation confère à LIP un effet inhibiteur des C/EBP (Williamson *et al.*, 1998). Chaque C/EBP possède un domaine C-terminal très conservé (environ 90 % d'homologie) qui comprend un domaine riche en acides aminés basiques constituant le domaine de liaison à l'ADN suivi d'un domaine de dimérisation appelé «leucine zipper» (Ramji et Foka, 2002) Les C/EBP peuvent hétérodimériser avec d'autres facteurs de transcription qui possèdent aussi un domaine bZIP (Hsu *et al.*, 1994; LeClair *et al.*, 1992; Vallejo *et al.*, 1993). C/EBP peut aussi dimériser avec des facteurs de transcription qui ne possèdent pas de domaines bZIP tel que p50 et p65 de NF- κ B (Stein *et al.*, 1993). La partie N-terminale des C/EBP est plus variable (moins de 20% d'homologie) sauf pour trois petites régions qui sont conservées entre les six isoformes (Angerer *et al.*, 1999; Cooper *et al.*, 1995; Nerlov et Ziff, 1994; Tang et Koeffler, 2001; Williams *et al.*, 1995; Williamson *et al.*, 1998). Ces trois régions représentent le domaine d'activation qui interagit avec les composantes de la machinerie cellulaire responsable de la transcription et permettant ainsi l'induction de la transcription de gènes (Angerer *et al.*, 1999; Cooper *et al.*, 1995; Nerlov et Ziff, 1994; Tang et Koeffler, 2001; Williams *et al.*, 1995; Williamson *et al.*, 1998). L'implication des C/EBP dans la génération des DCs n'est pas connue. Cependant, il a été démontré que C/EBP β est impliqué dans la différenciation et dans l'activation des macrophages (Poli, 1998; Screpanti *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1995). D'autres études ont rapporté que les macrophages de la rate de souris déficientes en C/EBP β ont une production d'oxyde nitrique et d'IL-12 réduite et par conséquent une faible induction d'une réponse immunitaire de type Th1 (Poli, 1998; Screpanti *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1995). Chez les macrophages de souris déficientes en C/EBP β , il a été démontré que l'IL-12p35 est fortement réduite tandis que l'IL-12p40 est fortement augmentée, ce qui explique l'incapacité des souris déficientes en C/EBP β de développer une réponse de type Th1 (Gorgoni *et al.*, 2002). Il a été démontré que l'IL-10 produite suite à la stimulation au LPS de macrophages péritonéaux de souris induit l'activation de STAT3 qui à son tour active C/EBP β (Tanaka *et al.*, 2005). Aucune étude n'a déterminé le rôle de C/EBP dans les fonctions des DCs, mais des études réalisées dans d'autres types cellulaires semblent démontrer une implication de ce facteur de transcription dans plusieurs fonctions tolérogènes.

Afin de pouvoir lier l'ADN, C/EBP β doit être phosphorylé sur plusieurs résidus, soit la Thréonine 188, la Thréonine 179 et la Sérine 184. La phosphorylation en Thréonine 188 est essentielle, mais pas suffisante pour lier l'ADN et elle est médiée par une MAP kinase telle que p38 ou ERK1/2 (Tang *et al.*, 2005). Cette phosphorylation permet le recrutement de C/EBP β à la GSK3 qui effectue la 2^e phosphorylation de C/EBP β en Thréonine 179 ou en Sérine 184 (Tang *et al.*, 2005). Cette 2^e phosphorylation induit un changement conformationnel de la protéine et permet la formation de pont disulfure ce qui rend accessible la région basique de C/EBP β et donc sa liaison à l'ADN (Kim *et al.*, 2007). Une étude a aussi démontré que la phosphorylation en Thréonine 188 permet à C/EBP β d'échapper à la dégradation par la cdk2 (Zhang *et al.*, 2012).

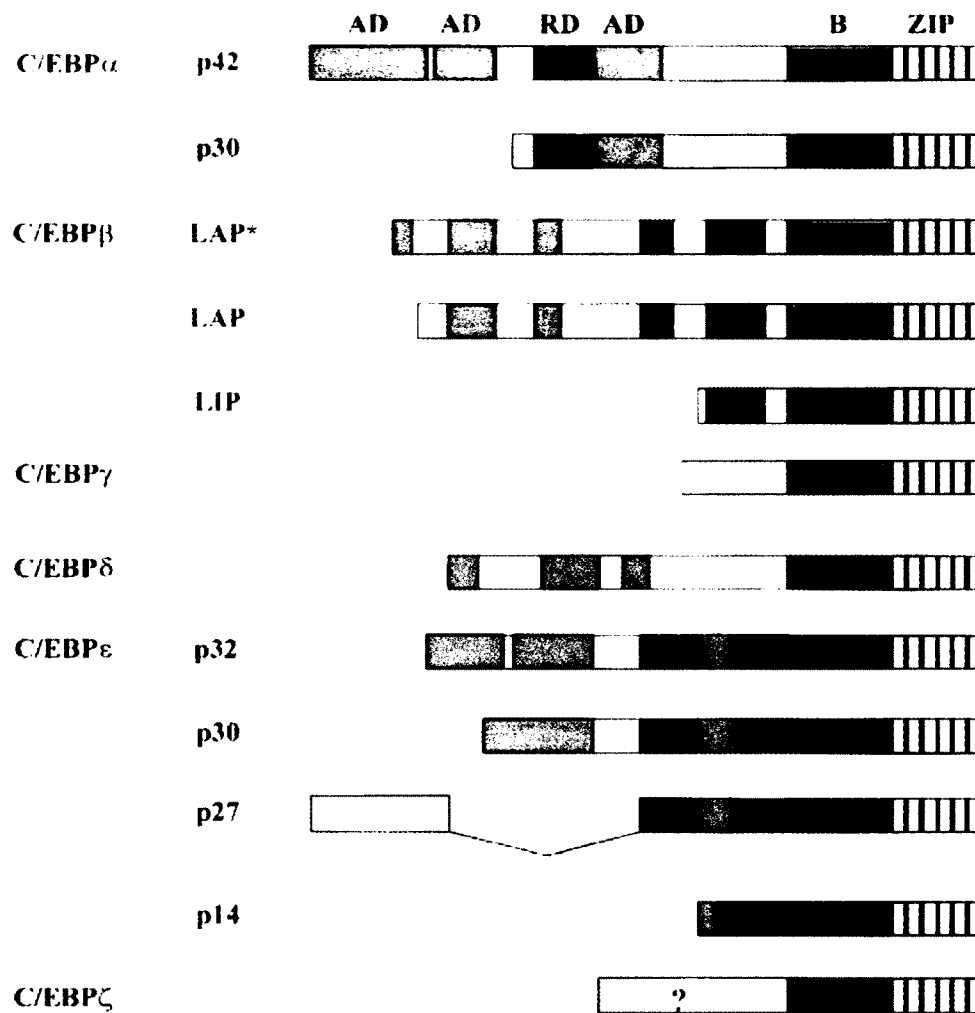


Figure 6. Représentation schématique des différents isoformes de C/EBP.

La figure présente les différents isoformes de C/EBP ainsi que les domaines fonctionnels retrouvés. On remarque en jaune le domaine leucine zipper et en rouge les domaines basiques permettant la liaison à l'ADN. Les domaines d'activation (AD) et de régulation négative (RD) sont aussi identifiés. Tiré de (Ramji et Foka, 2002)

1.11.9 AP-1

Le complexe dimérique AP-1 (activating protein-1) est un facteur de transcription qui régule l'expression de plusieurs gènes. Ce complexe est constitué des protéines de la famille Jun (c-Jun, JunB et JunD), des protéines de la famille Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 et Fra-2) ainsi que de quelques membres de la famille ATF (ATFa, ATF-2 et ATF-3) et de la famille JDP (JDP-1 et JDP-2) (Hess *et al.*, 2004). Toutes ces protéines possèdent un domaine «leucine-zipper» qui permet leur dimérisation, et qui est essentiel à leur translocation nucléaire. Les protéines de la famille Jun peuvent former des hétéro- et des homodimères, tandis que les protéines de la famille Fos ne peuvent pas former d'homodimères. Ces protéines doivent s'hétérodimériser avec des membres de la famille Jun (Hess *et al.*, 2004). c-Jun, c-Fos et FosB sont de puissants activateurs de la transcription tandis que JunB, JunD, Fra-1 et Fra-2 sont des activateurs faibles de la transcription, voire des inhibiteurs d'AP-1 en compétitionnant pour les sites de liaison (Hess *et al.*, 2004).

Le facteur de transcription AP-1 peut être activé par plusieurs stimuli comme les cytokines, les facteurs de croissance, les signaux de stress, les infections ainsi que les stimuli oncogéniques (Whitmarsh et Davis, 1996). Les membres de la famille Jun peuvent être activés par la MAP kinase JNK. L'activation des protéines de la famille Fos n'est pas bien définie. Plusieurs protéines kinases susceptibles d'activer les protéines Fos ont été identifiées. Il s'agit des protéines FRK (Fos-related kinase) (Deng et Karin, 1994), RSK (ribosomal S6 kinase) et ERK (Chen *et al.*, 1996).

Chez les DCs, une étude a montré que JunB est impliquée dans l'induction du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-12 en réponse à une stimulation au LPS (Gomard *et al.*, 2010). Cette étude montre aussi que l'expression de JunB est induite après la stimulation au LPS de façon dépendante de NF- κ B. Une autre étude a démontré qu'un équilibre existe entre l'activation d'AP-1 et NF- κ B chez les DCs suite à une stimulation au TNF- α (Kriehuber *et al.*, 2005). Dans cette étude, les auteurs démontrent que l'inhibition de NF- κ B entraîne une forte liaison d'AP-1 à l'ADN médiée par l'activation de la kinase JNK. La différence entre ces deux études peut s'expliquer du fait que la deuxième étude utilise le TNF comme activateur de DCs au lieu du LPS. La stimulation des DCs avec le LPS induit une production de TNF- α , la deuxième étude reproduit donc la deuxième

vague de stimulation observée dans la première étude. Il a été démontré que les prostaglandines (tel que la PGE_2) peuvent induire l'expression de la métalloprotéase MMP9 en induisant l'activation de la voie de l'AMPc, ce qui mène à l'activation de AP-1 et à la transactivation du promoteur du gène de MMP9 (Yen *et al.*, 2011). AP-1 est donc un facteur de transcription central activé par plusieurs voies de signalisation et il est impliqué dans la production de plusieurs médiateurs inflammatoires.

2 Prémisses au projet

Nous avons démontré dans des travaux antérieurs à cette thèse que l'injection de GM-CSF protège contre le développement du diabète de type 1 chez les souris NOD (Gaudreau *et al.*, 2007). Cette protection est médiée par les cellules dendritiques. Nous avons démontré que les DCs étaient essentielles à la protection contre la pathologie puisque les expériences de transferts adoptifs ont montré que l'injection de splénocytes déplétés en DCs ne protège pas les souris NOD. L'injection de GM-CSF permet d'induire une population de DCs tolérogènes qui expriment les molécules de costimulation à un niveau comparable aux DCs immatures de souris non-traitées (Gaudreau *et al.*, 2007). Cependant, lorsque la maturation de ces cellules est induite par le LPS, une très faible augmentation de l'expression des molécules de costimulation est observée. Il est donc possible de qualifier ces DCs de semi-matures puisque le processus de maturation ne se fait pas complètement. De plus, ces cellules produisent des quantités importantes d'IL-10, une cytokine impliquée dans la conversion des lymphocytes T naïfs en Tregs et qui diminue l'activation des lymphocytes T. Les souris traitées au GM-CSF montrent aussi une augmentation du nombre de lymphocytes Tregs comparativement aux souris contrôles (Gaudreau *et al.*, 2007). L'augmentation de ces lymphocytes Tregs serait due à la présence de cette sous-population de DCs semi-matures.

3 Rationnelle de recherche

La génération de DCs tolérogènes semble être une avenue très intéressante pour protéger contre le diabète de type 1. L'injection de GM-CSF induit une population de DCs qui est différente des populations de DCs retrouvées chez les souris non traitées. Le GM-CSF induit donc des changements morphologiques, mais aussi des changements fonctionnels chez les DCs. Nous voulions savoir quels sont les mécanismes moléculaires qui permettent d'expliquer ces différences observées entre les DCs tolérogènes et les DCs immunogènes. Nous voulions donc comprendre le fonctionnement moléculaire de ce traitement afin de pouvoir augmenter l'efficacité de ce dernier. La compréhension du mécanisme de fonctionnement de ce traitement

est aussi importante afin de pouvoir caractériser les molécules clés impliquées dans cette protection.

3.1 Objectif 1

Déterminer si le GM-CSF affecte les cellules de la moelle osseuse et leur différenciation en DCs.

3.2 Objectif 2

Générer un modèle *in vitro* de DCs qui permet d'étudier les différents mécanismes moléculaires impliqués dans les fonctions tolérogéniques des DCs.

3.3 Objectif 3

Élucider les mécanismes moléculaires expliquant la production différentielle de cytokines entre les DCs immunogènes et tolérogènes.

3.4 Objectif 4

Élucider les mécanismes moléculaires expliquant le phénotype semi-mature des DCs tolérogènes lorsque celles-ci sont stimulées au LPS.

4 Chapitre 1. Fonction des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris traitées au GM-CSF

4.1 Avant-propos

Dans ce chapitre, nous avons cherché à mieux comprendre comment le traitement des souris NOD avec du GM-CSF permettait de les protéger contre le diabète de type 1. Pour ce faire, nous avons étudié l'effet de l'injection du GM-CSF sur la différenciation des cellules souches de la moelle osseuse en cellules dendritiques. Les cellules de la moelle osseuse de souris traitées ou de souris contrôles ont été cultivées in vitro en présence de GM-CSF et d'IL-4. Nous avons ensuite comparé les fonctions et le phénotype des DCs obtenues après 7 jours de culture in vitro et après 48 heures de stimulation au LPS. Les résultats obtenus montrent que les DCs générées à partir des souris traitées au GM-CSF expriment plus de PD-L1 et produisent plus d'IL-10, deux molécules impliquées dans la tolérance immunitaire. Nos résultats montrent aussi que la forte expression de PD-L1 chez les DCs de souris traitées au GM-CSF est responsable de la faible activation des lymphocytes T CD8⁺. Ces résultats montrent que les DCs générées in vitro à partir de la moelle de souris traitées au GM-CSF possèdent la signature caractéristique des DCs tolérogènes. De plus, une seule injection de ces DCs stimulées au LPS protège les souris NOD contre le développement du diabète de type 1, ce qui confirme une fois de plus le rôle important des DCs dans la protection contre la pathologie. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication en 2010 dans la revue Cellular Immunology. Vous trouverez en annexe l'intégrale de la publication.

4.2 Matériel et Méthodes

4.2.1 Souris

Les souris NOD/LtJ ont été obtenues de chez Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Les femelles 8.3-NOD ont été obtenues du Dr. Santamaria (Université de Calgary, Alberta). Tous les animaux sont hébergés dans des conditions sans pathogène selon les normes du conseil canadien de la protection des animaux (CCPA).

4.2.2 Anticorps et cytométrie de flux

Les anticorps utilisés dans cette étude sont : les anticorps anti-CD8 (clone 53–6.7), anti-CD4 (clone GK1.5), anti-CD25 (clone 7D4), anti-CD80 (clone 16–10A1), anti-CD86 (clone GL1), anti-CD40 et anti-CD11c (clone HL3) achetés chez BD Biosciences (Mountain View, CA). Ces anticorps étaient couplés au FITC, PE ou à la biotine. Les anticorps anti-PD-L1 (clone MIH5) et anti-PD-L2 (clone TY25) couplés au PE ont été achetés chez eBiosciences (San Diego, CA). Pour les marquages FACS, 1×10^6 de cellules ont été incubées avec l'anticorps ou le cocktail d'anticorps pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées et acquises par le FACSCalibur (Becton Dickinson). Les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo (Tree Star Inc. Ashland, OR).

4.2.3 Traitement au GM-CSF

Les souris NOD femelles de trois semaines ont été injectées de façon intra-péritonéale avec 100ng/souris de GM-CSF recombinant (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) ou du PBS. Les souris ont été injectées trois fois par semaine pour les trois premières semaines puis deux fois par semaine par la suite. La détection du diabète se fait par l'analyse de la glycémie dans l'urine de la souris en utilisant des bandelettes réactives Uristix (Bayer, Minneapolis, MN). Un résultat positif est ensuite confirmé par la mesure du glucose sanguin grâce à un système de mesure Accu-Check Advantage (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Les tests de glucose ont été réalisés 2 fois par semaine jusqu'à 40 semaines pour les souris traitées au GM-CSF et jusqu'à ce que la maladie se déclare chez les souris traitées au PBS. Les animaux sont déclarés diabétiques après deux résultats positifs consécutifs par Uristix et lorsque les niveaux sanguins sont plus élevés que 15 mmol/l.

4.2.4 Génération des DCs

Les DCs ont été générées *in vitro* à partir de la moelle osseuse de souris NOD traitées au PBS ou au GM-CSF. Les DCs ont été générées en présence de GM-CSF (5 ng/ml) et d'IL-4 (4,5 ng/ml) (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN) pendant 7 jours. Au 7ème jour, les cellules ont été récupérées puis stimulées ou non au LPS (1 µg/ml pour 24 h ou 48 h). Dans certaines

expériences, l'IL-10 (10 ng/ml) (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN) a aussi été ajoutée lors de la stimulation au LPS. Le phénotype des DCs a ensuite été déterminé par cytométrie de flux.

4.2.5 ELISA

Les DCs ont été récupérées au jour 7 et ont été remises en culture (1×10^6 cellules/ml) en présence de GM-CSF (5 ng/ml) et d'IL-4 (4,5 ng/ml) puis stimulées au non au LPS (1 μ g/ml). Après 24 h et 48 h de stimulation, les surnageants ont été récupérés et la production de cytokines a été déterminée par ELISA selon le protocole fourni par le manufacturier (R&D Systems Minneapolis, MN). Brièvement, l'anticorps de capture adhère à la plaque (Nunc) pendant 16 heures à température ambiante. Par la suite, la plaque est lavée et bloquée avec une solution de sucrose 5% et de BSA 1%. Les échantillons à doser sont ensuite déposés dans les puits et incubés deux heures à température ambiante. Après un cycle de trois lavages, l'anticorps de détection couplé à la biotine est déposé dans les puits pour une durée de deux heures à température ambiante. Par la suite, la plaque est lavée à nouveau et la streptavidine-HRP est ajoutée pour une durée de 20 minutes. Après un autre cycle de lavage, le substrat (mélange 1:1 de H_2O_2 et de Tétraméthylbenzidine) est ajouté et la réaction est arrêtée par l'ajout d'acide phosphorique. La lecture de la plaque est effectuée à la longueur d'onde 450 nm en soustrayant la lecture obtenue à 570 nm.

4.2.6 Essais de prolifération

Les BMDCs ont été récoltées et irradiées à 2400Gy puis pulsées avec 1 μ g/ml du peptide NRP-A7 (KYNKANAFL), un peptide spécifiquement reconnu par les lymphocytes T CD8⁺ de souris 8.3-NOD ou 1 μ g/ml du peptide TUM (KYQAVTTTL), un peptide contrôle. Les BMDCs ont été mises en culture dans une plaque 96 puits à fond rond à une densité de 5000 cellules par puits. Les lymphocytes T CD8⁺ ont été purifiés à partir de la rate de souris transgéniques 8.3-NOD à l'aide de billes magnétiques (Miltenyi Biotec, Inc., Auburn, CA) ont été ajoutés (2×10^4 cellules/puits) aux cellules dendritiques, puis incubés à 37°C. Dans certaines expériences, un anticorps contrôle (10 μ g/ml, rat IgG2a) ou un anticorps bloquant dirigé contre PD-L1 (clone MIH5) ou PD-L2 (clone TY25) a été ajouté. Après 48 heures, le surnageant a été récupéré pour analyser la production des cytokines, et a été remplacé par du milieu frais contenant 1 μ Ci thymidine tritiée.

Après 16 heures de culture, l'incorporation de thymidine tritiée a été mesurée grâce à un compteur de rayonnements β .

4.2.7 Transfert adoptif

Les souris NOD/LtJ femelles de trois semaines ont reçu par injection intraveineuse des BMDCs de souris traitées au GM-CSF ou de souris traitées au PBS stimulées ou non au LPS. Par la suite, un suivi du développement de la pathologie a été fait tel que décrit plus haut.

4.2.8 Histopathologie

Les pancréas des souris ont été fixés dans la formaline et enrobés de paraffine. Des coupes de tissus ont ensuite été faites à l'aide du microtome et elles ont été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. L'infiltration des îlots a ensuite été évaluée selon les scores suivants: 0, îlot non infiltré; 1, îlot montrant une infiltration leucocytaire en périphérie seulement; 2, infiltration leucocytaire jusqu'à 25% de la superficie de l'îlot; 3, infiltration leucocytaire jusqu'à 75% de la superficie de l'îlot, et 4, moins de 20% de l'îlot est encore présent.

4.2.9 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Des tests t de Student, des tests de two-way ANOVA et des tests de χ^2 ont été effectués pour analyser les données. Les différences ont été considérées significatives lorsque $p < 0.05$.

4.3 Résultats

4.3.1 Phénotype et fonctions des BMDCs générées de souris NOD traitées au GM-CSF

Puisque les DCs spléniques de souris traitées au GM-CSF possèdent des caractéristiques tolérogènes et sont impliquées dans la protection contre le diabète de type 1, nous nous sommes demandés si le traitement affecte les cellules déjà différenciées ou s'il affecte les précurseurs hématopoïétiques au niveau de la moelle osseuse. Nous avons donc prélevé la moelle osseuse des souris traitées au GM-CSF (GM.BMDCs) et des souris contrôles (traitées au PBS) (PBS.BMDCs) et nous avons généré des DCs *in vitro*. Les DCs ont été générées en présence de GM-CSF et d'IL-4, des conditions qui favorisent la génération de DCs immunogènes. Les marquages FACS ont permis de déterminer les niveaux d'expression des molécules de costimulation des DCs. Les résultats montrent qu'après 7 jours de culture, les GM.BMDCs et les PBS.BMDCs possèdent un phénotype immature caractérisé par une faible expression de CD80 et de CD86 (Figure 1A et B). Suite à une stimulation au LPS, les deux types de cellules montrent un phénotype mature caractérisé par une augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40 (Figure 1A et B). Une autre caractéristique des DCs immunogènes est leur production importante de cytokines pro-inflammatoires. Nous avons donc mesuré la production de IL-12p70 et d'IFN- γ par ces 2 types de DCs. Les résultats montrent que les GM.BMDCs produisent beaucoup moins d'IL-12p70 et d'IFN- γ ($p < 0.001$) et produisent plus d'IL-10 ($p < 0.001$) que les PBS.BMDCs (Figure 1 C, D et E). Aucune différence significative n'a été obtenue pour la production d'IL-6 et de TNF α (résultats non montrés).

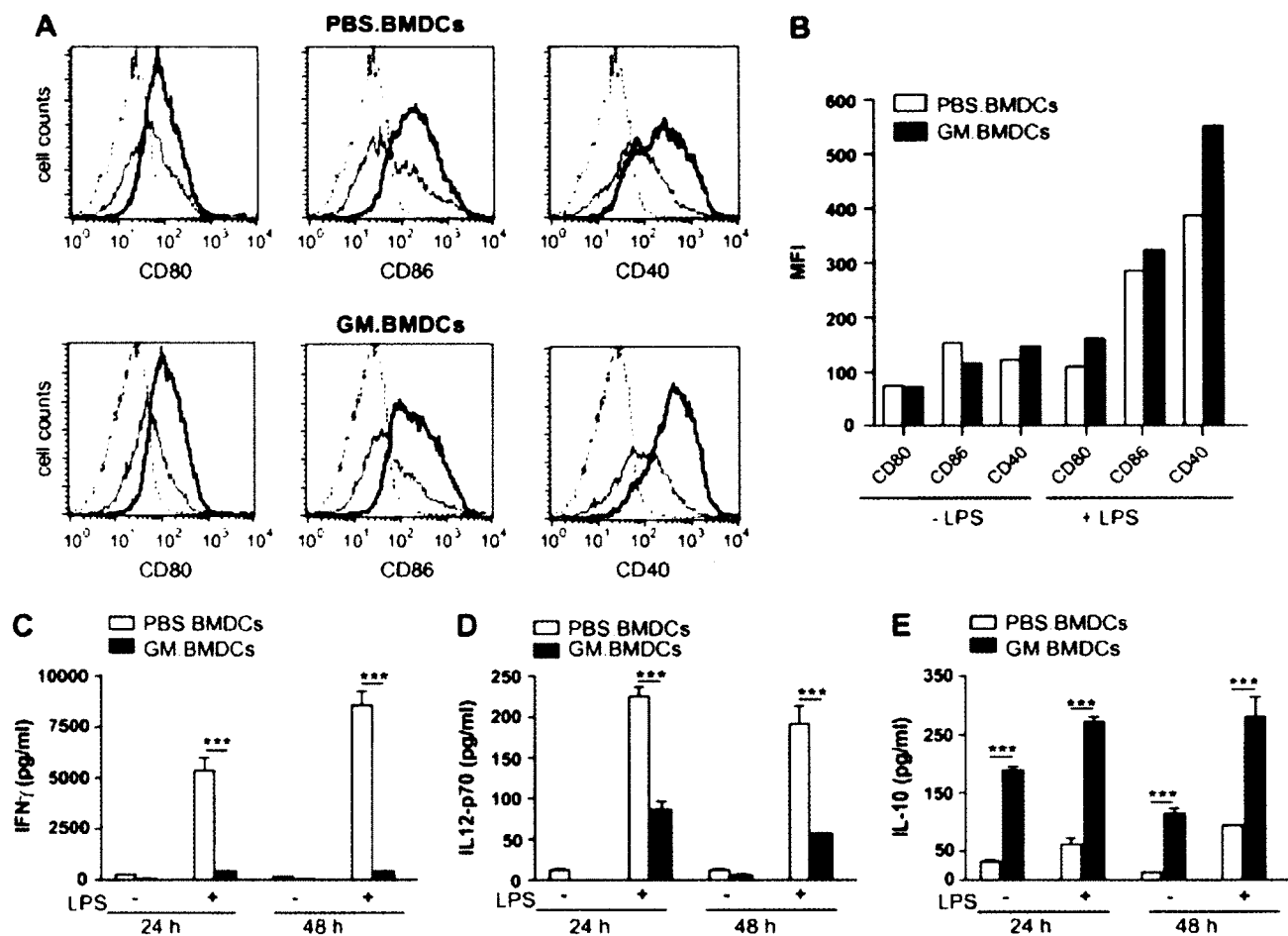


Figure 1. Phénotype et fonctions des PBS.BMDCs et des GM.BMDCs.

Les BMDCs ont été générées à partir de la moelle osseuse de souris NOD traitées au PBS (PBS.BMDCs) ou au GM-CSF (GM.BMDCs) et analysées par FACS. Les niveaux d'expression de CD80, CD86 et CD40 ont été analysés avant (ligne pleine fine) ou après (ligne pleine en gras) stimulation au LPS (1 μ g/ml) pendant 48 heures (A). Les lignes en pointillées représentent le marquage avec l'isotype contrôle. L'intensité de fluorescence moyenne (MFI) de ces marquages a été évaluée avant et après stimulation au LPS et les valeurs sont présentées en (B). Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Les surnageants ont aussi été récupérés et la production de cytokine a été analysée après 24 et 48 heures de stimulation au LPS (1 μ g/ml). Les concentrations d'IFN- γ (C), d'IL-12p70 (D) et d'IL-10 (E) produites par les GM.BMDCs et les PBS.BMDCs ont été mesurées par ELISA. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM et sont représentatifs de 4 expériences indépendantes (***) $p < 0.001$.

Par la suite, nous avons évalué la capacité des GM.BMDCs et des PBS.BMDCs à induire la prolifération des lymphocytes 8.3-CD8⁺ qui sont hautement diabétogènes. Les DCs ont été générées *in vitro* tel que mentionné plus haut et ont été pulsées avec le peptide NRP-A7 ou TUM (contrôle), puis co-cultivées avec des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques pour le peptide NRP-A7. Les résultats montrent que lorsque non stimulées au LPS, les deux types de DCs induisent une prolifération similaire des lymphocytes T CD8⁺ (Figure 2A). Cependant, lorsque les DCs sont stimulées au LPS, on remarque que les GM.BMDCs induisent une prolifération moins importante des lymphocytes T CD8⁺ comparativement aux PBS.BMDCs (Figure 2B). De plus, la production d'IL-2 et IFN- γ (Figure 2C et D) des lymphocytes T CD8⁺ est beaucoup plus faible lorsque ces derniers sont co-cultivés avec des GM.BMDCs. Ces résultats nous indiquent que le traitement au GM-CSF affecte directement les précurseurs de la moelle osseuse et favorise leur différenciation en DCs possédant des caractéristiques tolérogènes.

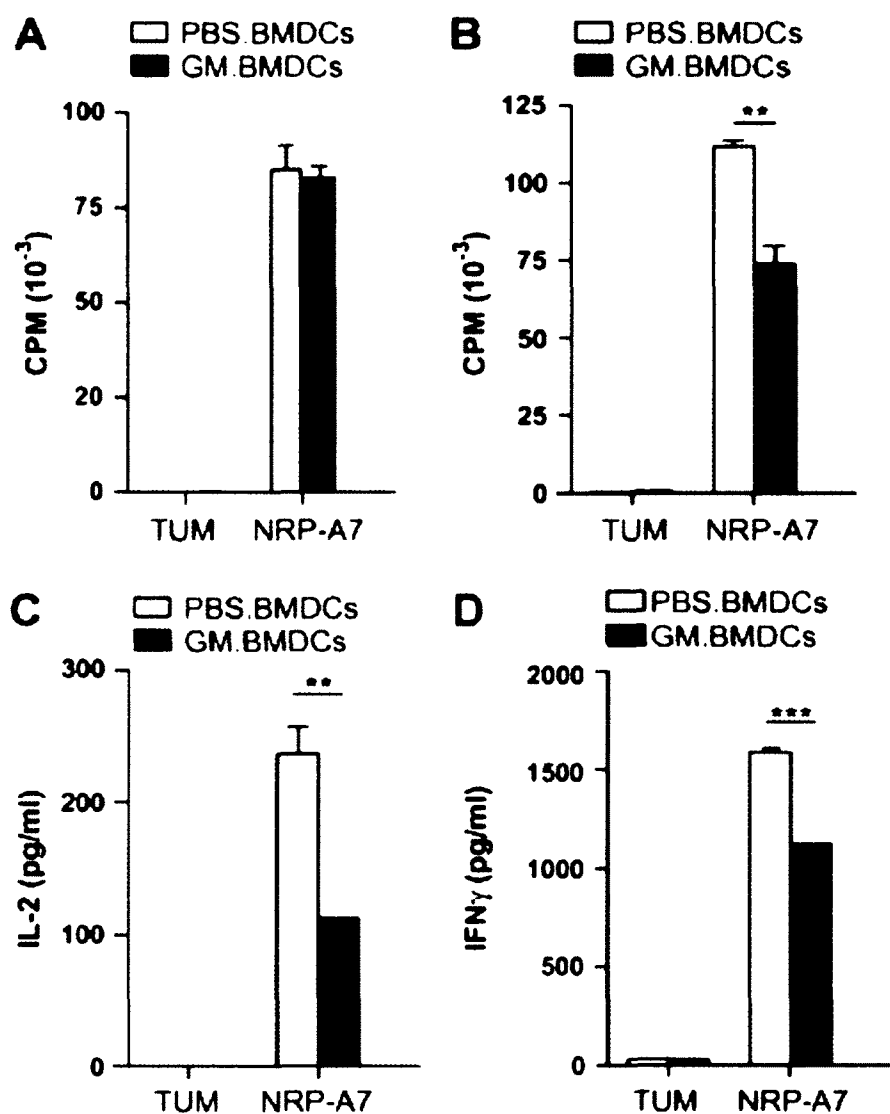


Figure 2. Prolifération et production de cytokines par des lymphocytes T 8.3-CD8 $^{+}$ co-cultivés avec des GM.BMDCs ou des PBS.BMDCs.

Les GM.BMDCs et les PBS.BMDCs ont été irradiées et pulsées avec le peptide NRP-A7 ou TUM (contrôle) (1 μ g/ml) puis co-cultivées avec des lymphocytes T 8.3-CD8 $^{+}$. La prolifération des lymphocytes T 8.3-CD8 $^{+}$ a été mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée. Les résultats présentés en (A) ont été obtenus lorsque les DCs n'ont pas été stimulées au LPS, et en (B), lorsque les DCs sont stimulées 48 heures au LPS (1 μ g/ml, 48 h). Les surnageants ont aussi été analysés afin de déterminer la production d'IL-2 (C) et d'IFN- γ (D) par les lymphocytes T 8.3-CD8 $^{+}$ co-cultivés avec les PBS.BMDCs et les GM.BMDCs stimulées au LPS et pulsées avec 1

µg/ml du peptide NRP-A7 ou du peptide TUM (contrôle). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM et sont représentatifs de 4 expériences indépendantes. (**p < 0.01; ***p < 0.001).

4.3.2 Contribution de PD-L1 dans la diminution de la prolifération et de la production de cytokines des lymphocytes T lorsque co-cultivés avec des GM.BMDCs.

Une étude a déjà démontré que la stimulation au GM-CSF de DCs induit l'expression de PD-L1 et de PD-L2 (Yamazaki *et al.*, 2002). De plus, le blocage de la voie PD-L1/PD-1 augmente la prolifération et la production de cytokines par les lymphocytes T CD8⁺ (Keir *et al.*, 2007). Nous avons donc analysé les niveaux d'expression de PD-L1 et de PD-L2 chez les BMDCs. Les résultats de FACS montrent que les GM.BMDCs non stimulées montrent un niveau d'expression élevé de PD-L1 comparativement aux PBS.BMDCs non stimulées (Figure 3A). Cependant aucune différence n'est remarquée entre les deux types de cellules pour ce qui est de l'expression de PD-L2 (Figure 3B). De plus, suite à une stimulation au LPS, on remarque une augmentation plus importante de l'expression de PD-L1 chez les GM.BMDCs comparativement au PBS.BMDCs (Figure 3A et B). Aucune différence n'a été observée entre le niveau d'expression de PD-L2 chez les GM.BMDCs et les PBS.BMDCs. Afin de s'assurer que la production d'IL-10 par les GM.BMDCs n'est pas responsable de l'augmentation de l'expression de PD-L1 et de la diminution de la prolifération des lymphocytes T CD8⁺, les PBS.BMDCs ont été stimulées au LPS en présence d'IL-10 exogène. L'ajout d'IL-10 n'a pas affecté les niveaux d'expression de PD-L1 et de PD-L2 (Figure 3C). De façon similaire, la prolifération des lymphocytes T CD8 n'est pas affectée par l'ajout d'IL-10 exogène (Figure 3D).

Nous avons ensuite déterminé l'implication des voies PD-L1/PD-1 et PD-L2/PD-2 dans la prolifération et la production de cytokines par les lymphocytes T 8.3-CD8⁺ co-cultivés avec des GM.BMDCs. Les GM.BMDCs ont été stimulées au LPS pendant 48 heures puis pré-incubées avec un anticorps bloquant dirigé contre PD-L1 avant d'être co-cultivées en présence de lymphocytes T 8.3-CD8⁺. Les résultats obtenus montrent que le blocage de la voie PD-L1/PD-1 chez les GM.BMDCs stimulées au LPS permet de restaurer la prolifération des lymphocytes (Figure 3E) ainsi que la production d'IL-2 et d'IFN- γ (Figures 3F et G) à des niveaux similaires à ceux obtenus avec les PBS.BMDCs stimulées au LPS. Étonnamment, le blocage de PD-L2 diminue la prolifération des lymphocytes T 8.3-CD8⁺, et ce avec les BMDCs des deux types de souris (Figure 3E). Ces résultats démontrent l'importance de la voie inhibitrice PD-1/PD-L1 dans

la diminution de la prolifération et de la production d'IL-2 et d'IFN- γ par les lymphocytes T 8.3-CD8⁺ diabétogènes lorsque co-cultivés avec des GM.BMDCs stimulées au LPS.

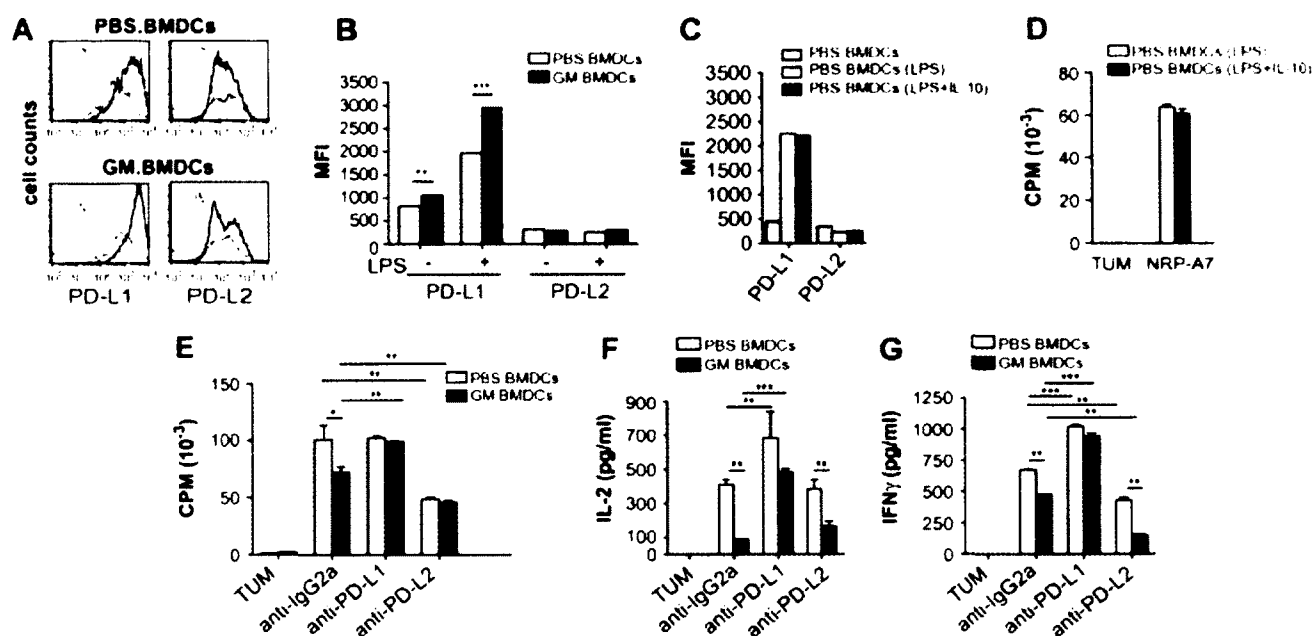


Figure 3. Expression et fonction de PD-L1 et PD-L2 chez les GM.BMDCs et les PBS.BMDCs.

Les GM.BMDCs et les PBS.BMDCs ont été générées *in vitro* et les analyses FACS ont été effectuées avant (lignes fines) et après 48 heures de stimulation au LPS (1 µg/ml) (lignes en gras) afin de déterminer les niveaux d'expression de PD-L1 et de PD-L2 (A). Les lignes pointillées représentent les marquages avec l'isotype contrôle. Les niveaux d'expression de PD-L1 et de PD-L2 sont aussi montrés en intensité moyenne de fluorescence (MFI) (B). Les PBS.BMDCs ont aussi été stimulées au LPS en présence d'IL-10 exogène (10 ng/ml), puis les niveaux d'expression de PD-L1 et de PD-L2 ont été analysés par FACS et sont représentés en MFI (C). La prolifération des lymphocytes T 8.3-CD8⁺ a été analysée lorsque ces derniers sont co-cultivés avec des PBS.BMDCs stimulées au LPS en présence ou en absence d'IL-10 exogène (D). La prolifération (E) et la production d'IL-2 (F) et d'IFN-γ (G) des lymphocytes T 8.3-CD8⁺ co-cultivés avec des PBS.BMDCs ou des GM.BMDCs stimulées au LPS, irradiées et pulsées avec le peptide NRP-A7 ou TUM (contrôle) a été mesurée en présence d'anticorps bloquant dirigé contre PD-L1 (10 µg/ml), contre PD-L2 (5 µg/ml) ou un isotype contrôle (10 µg/ml). Les données sont présentées en moyenne ± SEM et sont représentatives de trois expériences indépendantes. (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

4.3.3 Induction d'une protection à long terme contre le diabète de type 1 par les GM.BMDCs

Les résultats obtenus *in vitro* nous ont menés à étudier l'implication des GM.BMDCs dans la protection contre le diabète de type 1 chez les souris NOD. Pour ce faire, les souris NOD femelles de trois semaines d'âge ont reçu une injection de BMDCs stimulées au non au LPS et ont été suivies pour le développement du diabète de type 1 sur une période de 36 semaines. Les résultats montrent que les GM.BMDCs et les PBS.BMDCs non stimulées ne protègent pas la souris receveuse contre le diabète de type 1 (100% et 80% des animaux receveurs ont développé la maladie respectivement) (Figure 4A). Cependant, les PBS.BMDCs stimulées au LPS retardent l'apparition de la maladie ($p < 0.03$) mais ne protègent pas contre la maladie (83% des animaux receveurs sont devenus diabétiques) (Figure 4A). Cependant, les GM.BMDCs stimulées au LPS diminuent de façon significative ($p < 0.05$) l'incidence de la pathologie (seulement 25% des animaux développent le diabète) (Figure 4A) et l'insulite (Figure 4B et C). Ces observations montrent que le traitement des souris NOD au GM-CSF affecte les précurseurs de la moelle et permet leur différenciation en cellules dendritiques tolérogènes impliquées dans la protection contre le diabète de type 1.

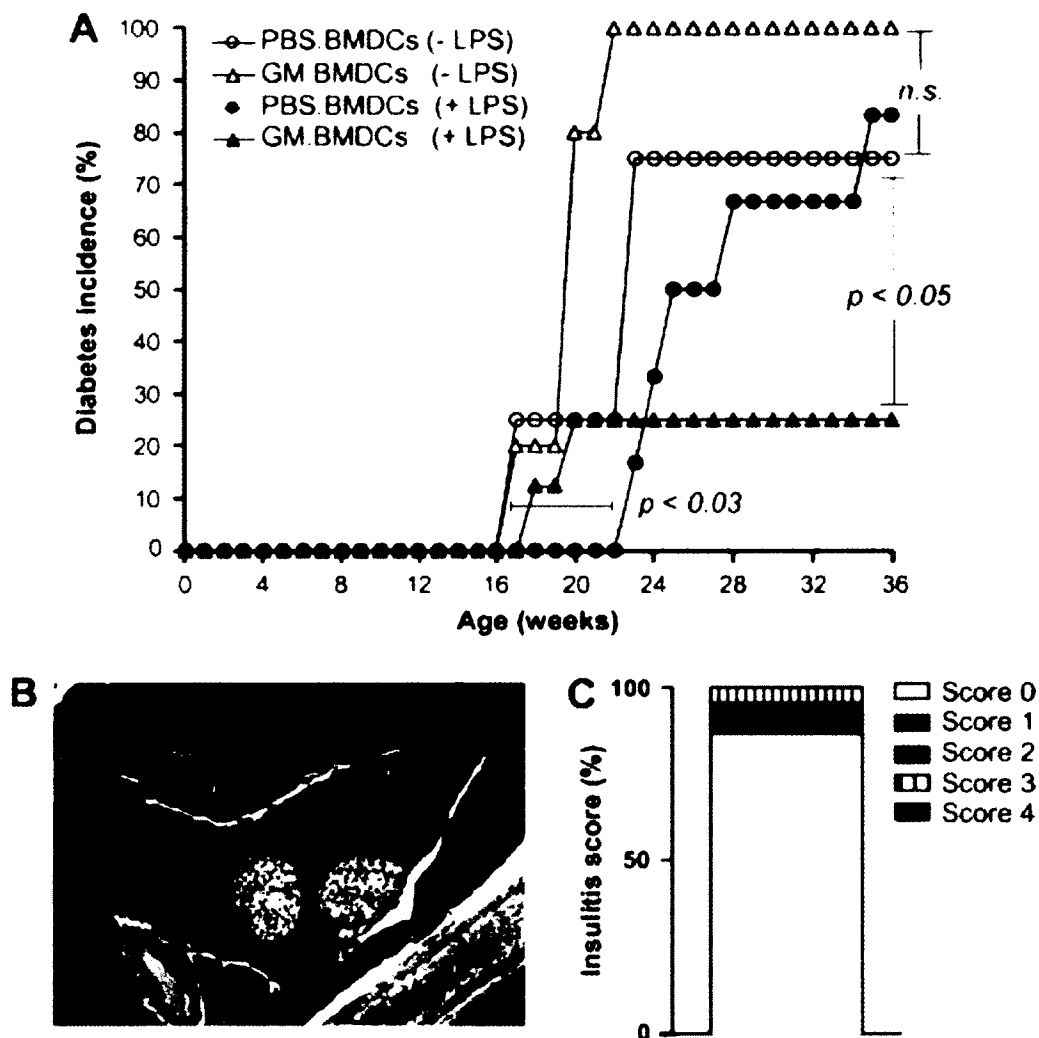


Figure 4. Prévention du développement du diabète de type 1 par les GM.BMDCs stimulées au LPS.

Les PBS.BMDCs ou les GM.BMDCs (2×10^6 cellules) stimulées ou non au LPS ont été injectées par voie intraveineuse à de jeunes souris NOD âgées de trois semaines (5 à 8 souris par groupe). Les souris receveuses ont ensuite été suivies pour le développement du diabète de type 1 jusqu'à 36 semaines d'âge (A). Une image représentative obtenue par microscopie de pancréas des souris receveuses de GM.BMDCs stimulées au LPS à 36 semaines d'âge, fixés puis colorés à l'hématoxyline-éosine (B). Les scores d'infiltration des îlots de pancréas des souris NOD ayant

reçu des GM.BMDCs stimulées au LPS ont été analysés lorsque les souris ont atteint 36 semaines d'âge. Un minimum de 20 îlots a été analysé par souris (C).

5 Chapitre 2. Caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans les fonctions tolérogènes des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse en présence de GM-CSF

5.1 Differential role of NF- κ B, ERK1/2 and AP-1 in modulating the immunoregulatory functions of bone marrow-derived dendritic cells from NOD mice

Chantal Guindi¹, Michaël Ménard¹, Alexandre Cloutier, Simon Gaudreau, Gilles Besin, Pierre Larivée, Patrick P. McDonald, Gilles Dupuis, Abdelaziz Amrani

Immunology Division, Faculty of Medicine and Health Sciences, and Centre de Recherche Clinique Etienne LeBel, University of Sherbrooke, 3001 12th Avenue North, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 5N4

Received 26 June 2011. Accepted 5 October 2011. Available online 15 October 2011. Cellular Immunology

5.1.1 Avant-propos

Dans cet article, j'ai effectué environ les deux tiers des expériences et j'ai aussi planifié et coordonné la réalisation des expériences. Le travail avec des animaux requiert une planification particulière afin d'assurer la disponibilité des animaux et le maintien des différentes souches. Les coûts associés à la génération des DCs étant importants, toutes les cellules devaient être utilisées, il fallait donc souvent revoir le plan des expériences planifiées soit par manque de cellules soit pour utiliser toutes les cellules générées. La génération des cellules demande aussi 7 ou 9 jours de différenciation *in vitro*, avec de nombreux changements de milieux, il faut donc prévoir tout ce la dans le plan de travail. Michaël Ménard est co-premier auteur puisque ce dernier a mis au point la méthode de culture *in vitro* des GM/DCs, ce qui lui a demandé beaucoup de travail et il a participé à la réalisation de plusieurs expériences. J'ai aussi rédigé l'article et fait les expériences afin de répondre aux commentaires des évaluateurs.

5.1.2 Résumé

Dans cet article, nous avons caractérisé un modèle que l'on a développé afin de générer des DCs tolérogènes *in vitro*. Nous avons aussi comparé ces DCs à celles obtenues lorsque la moelle osseuse est cultivée en présence de GM-CSF et d'IL-4. Par la suite, nous avons caractérisé les deux types de cellules. Les GM/DCs montrent une faible augmentation de l'expression des molécules de costimulation suite à une stimulation de 48 heures au LPS, comparativement aux IL-4/DCs. De plus, les GM/DCs ne sont pas capables d'induire une prolifération importante des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ comparativement aux IL-4/DCs. De plus, les GM/DCs stimulées au LPS produisent des concentrations importantes d'IL-10 tandis que les IL-4/DCs produisent plus d'IL-12p70 et d'IFN- γ . Les GM/DCs sont capables de convertir les lymphocytes T naïfs en Tregs ainsi que d'accroître les Tregs déjà existants. Les IL-4/DCs sont uniquement capables de convertir les lymphocytes T naïfs en Tregs. Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes moléculaires qui expliquent ces différences. Nous avons déterminé que l'activation soutenue de ERK1/2 est responsable d'environ 50% de la production d'IL-10 par les GM/DCs et que le facteur de transcription AP-1 est essentiel à cette induction. De plus, nous avons déterminé que le facteur de transcription NF- κ B se liait à l'ADN dans les deux types de DCs mais que chez les GM/DCs on ne retrouvait pas la sous-unité RelB comparativement aux IL-4/DCs. Par la technique de ChIP, nous avons aussi démontré un recrutement préférentiel de NF- κ B au niveau du promoteur de l'IL-10 chez les GM/DCs et un recrutement préférentiel au niveau du promoteur de l'IL-12p35 chez les IL-4/DCs. En somme, nous avons identifié dans cet article quelques-uns des mécanismes moléculaires responsables des différences de phénotypes et de fonctions entre les GM/DCs et les IL-4/DCs.

5.1.3 Abstract

Tolerogenic dendritic cells represent a promising immunotherapy in autoimmunity. However, the molecular mechanisms that drive tolerogenic DCs functions are not well understood. We used GM-CSF or GM-CSF+IL-4 to generate tolerogenic (GM/DCs) and immunogenic (IL-4/DCs) BMDCs from NOD mice, respectively. GM/DCs were resistant to maturation, produced large

amounts of IL-10 but not IL-12p70. GM/DCs displayed a reduced capacity to activate diabetogenic CD8⁺ T-cells and were efficient to induce Tregs expansion and conversion. LPS stimulation triggered ERK1/2 activation that was sustained in GM/DCs but not in IL-4/DCs. ERK1/2 and AP-1 were involved in IL-10 production in GM/DCs but not in their resistance to maturation. Supershift analysis showed that NF-κB DNA binding complex contains p52 and p65 in GM/DCs, whereas it contains p52, p65 and RelB in IL-4/DCs. ChIP experiments revealed that p65 was recruited to IL-10 promoter following LPS stimulation of GM/DCs whereas its binding to IL-12p35 promoter was abolished. Our results suggest that immunoregulatory functions of GM/DCs are differentially regulated by ERK1/2, AP-1 and NF-κB pathways.

Highlights

DCs of NOD generated with GM-CSF (GM/DCs) are tolerogenic. GM/DCs induce better Treg conversion and expansion. GM/DCs produce high levels of IL-10 and very low amount of IL-12p70. ERK1/2 and AP-1 regulate IL-10 production but not in maturation resistance. IL-10 and IL-12 production are regulated by the nature of dimers in NF-κB complex.

Keywords

Dendritic cells; Tolerogenic; Type 1 diabetes; Cytokines

5.1.4 Introduction

Dendritic cells (DCs) are professional APCs that reside in peripheral tissues as immature DCs (iDCs). The capacity of DCs to induce appropriate immune responses, leading to immunity or to T-cell tolerance, depends on their status of activation [1]. Mature DCs (mDCs) express high levels of MHC class II, CD80, CD86, and CD40 molecules, lose their capacity to phagocytose antigens (Ags), and are initiators of primary immune responses [1]. Tolerogenic iDCs and semimature DCs (smDCs) express low levels of costimulatory molecules and induce T-cell tolerance by promoting T-cell anergy, and/or Treg differentiation [2]. Furthermore, smDCs produce low amounts of inflammatory cytokines IL-12p70, IFNγ, and TNFα [3] and [4], but secrete considerable amounts of anti-inflammatory IL-10 that influence DCs maturation and

functions [5], [6] and [7].

Whereas the essential role of smDCs in inducing and maintaining T-cell tolerance is well established [8] and [9], the molecular mechanisms favoring the emergence of smDCs remain largely unknown. The critical steps in regulating gene expression associated with DCs development, maturation and function involve activation of the transcription factor NF- κ B [10], [11], [12] and [13] and one or more components of the MAP kinase pathways [12], [14] and [15]. NF- κ B consists of homo- or heterodimers containing the p50, p52, p65 (RelA), c-Rel, and/or RelB subunits [16]. The classical pathway of the NF- κ B activation involves phosphorylation and degradation of I κ B α , leading NF- κ B dimers to translocate from the cytosol to the nucleus, where they interact with specific DNA binding site in the regulatory region of target genes to up-regulate their expression [16]. The alternative NF- κ B pathway is independent of I κ B α degradation and involves proteolysis of p100 to generate p52 which is associated mainly with RelB [17]. Experiments using inhibitors of I κ B α degradation [12], RNA interference [18], or mice lacking components of the NF- κ B pathway [11], have implicated the NF- κ B pathway in DCs maturation and function. A decreased number of DCs in the spleen and in the thymus, and an impaired antigen-presenting capacity have been reported in RelB^{-/-} mice [10]. In addition, BMDCs from RelB^{-/-} mice express low levels of CD40, MHC class II and CD86 and suppress a primed immune response when compared to BMDCs of RelB^{+/+} mice [19]. The production of IL-10 by regulatory DCs has been linked to the activation of the ERK1/2 signaling pathway [20], [21] and [22]. However, Escors et al. [23] have reported that ERK activation was necessary but not sufficient for IL-10 production by regulatory DCs, and that the transcription factor IRF3 contributed to IL-10 secretion.

Abnormal maturation and function of DCs have been reported in diabetes in humans as well as in the NOD mouse model [24] and [25]. Consequently, high levels of expression of CD80, CD86 and MHC class II, along with increased production of inflammatory cytokines (IL-12, IFN γ), lead to uncontrolled autoimmune responses as observed in NOD mice [26], [27] and [28]. These DCs abnormalities have been associated with enhanced activation of NF- κ B, due to the hyperactivity of the IKK β kinase [27], [28] and [29]. We have previously reported that the treatment of NOD mice with GM-CSF induced the generation of smDCs that sustained a Treg-dependent protection against autoimmune diabetes [4]. We now report that BMDCs of NOD generated with GM-CSF

(GM/DCs) in vitro acquired the signature of immunoregulatory smDCs that produced high levels of IL-10 and very low amounts of IL-12p70 and that induced Treg differentiation more efficiently than IL-4/DCs. The semimature phenotype of GM/DCs was not regulated through ERK1/2 although the production of IL-10 and IL-12p70 involved the activation of ERK1/2 and AP-1. Analysis of the DNA binding complexes of NF- κ B revealed that they consisted of p52 and p65 in smGM/DCs whereas they consisted of p52, p65 and RelB in fully mature IL-4/DCs. Furthermore, chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments revealed that the p65 strongly bound to the IL-10 promoter in LPS-stimulated GM/DCs and LPS-stimulated IL-4/DCs whereas it strongly bound to IL-12p35 promoter in IL-4/DCs.

5.1.5 Materials and methods

Mice

NOD mice were from Taconic (Hudson, NY). NOD BDC2.5 and NOD.IL-10^{-/-} mice were from Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). 8.3-NOD mice were obtained from Dr. Pere Santamaria, (University of Calgary, AB). All mice were housed under pathogen-free conditions, in accordance with the guidelines of the Institutional Animal Care Committee.

Antibodies

Antibodies used for flow cytometry were anti-CD11c (HL3), anti-CD86 (GL1), anti-CD80 (16-10A1) anti-CD4 (L3T4) and anti-CD25 (3C7) and were from BD Bioscience (Mississauga, ON). The anti-Foxp3 mAb (FJK-16s) was from eBioscience (San Diego, CA) whereas the anti-rat IgG was from Pierce (Rockford, IL). The anti-CD40 antibody was purified from supernatants of the FGK4.5.5 hybridoma. Antibodies for Western blotting (anti-ERK1/2, anti-pERK1/2, anti-I κ B and anti- β -actin) were from Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA). Antibodies used in supershift assays were anti-p50 (SC-7178X), anti-p52 (sc-298X), anti-p65 (sc-372X), anti-RelB (sc-226X) and anti-c-Rel (sc-70X) and were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA). The anti-IL-10 antibody (JES5-2A5) was from eBioscience (San Diego, CA).

BMDCs preparation

BMDCs were generated with GM-CSF (5 ng/ml) or a combination of GM-CSF (5 ng/ml) and IL-4 (4.5 ng/ml) (Cedarlane, Burlington, ON) as described [30].

Flow cytometry

Cells were stained using FITC-conjugated anti-CD11c, anti-rat IgG, biotin-labeled anti-CD86 and anti-CD80. Intracellular Foxp3 staining was done using a FITC-conjugated anti-mouse/rat staining kit (eBiosciences). The cells were analyzed with a FACScalibur instrument (BD Biosciences, Mississauga, ON) equipped with the CellQuest software.

Cytokine production

BMDCs were harvested at day 7 of culture and plated at 1×10^6 cells/ml in a 96-well culture plates (200 μ l/well). Cells were left unstimulated or stimulated with LPS (1 μ g/ml) (Sigma–Aldrich, St Louis, MO) for 24 or 48 h. The amounts of IL-10, IL-12p70 and IFN γ present in the supernatants were quantified using ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Proliferation assays and cytokine measurement

CD8⁺ T lymphocytes were purified from 8.3-NOD mice using a magnetic sorting kit (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) and incubated (2×10^4 cells/well) with NRP-A7 or TUM peptide-pulsed (0.01–1 μ g/ml) irradiated-BMDCs (5×10^3 cells/well) for 3 days at 37 °C. CD4⁺CD25[−] T cells were purified from NOD BDC2.5 mice using same technique and incubated (2×10^4 cells/well) with BDC2.5 mimotope 1040-31 peptide-pulsed (Cederlane, Burlington, ON) (0.0025–0.25 μ g/ml) irradiated-BMDCs (5×10^3 cells/well) for 3 days at 37 °C. Supernatants were collected 48 h later for cytokine quantification using ELISA. For proliferations essays, cells were pulsed with [³H] thymidine (1 μ Ci /well) during the last 18 h of cultures, harvested and radioactivity counted.

Treg differentiation assays

CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25[−] T-cells were purified using a commercial isolation kit (Milteny Biotec) and cultured (2×10^5 cells/well) with anti-CD3 (5 μ g/ml) and IL-2 (20 U/ml) in the presence or absence of unstimulated or LPS-stimulated BMDCs (5×10^4 cells). On days 4 and 7 of culture, converted Tregs were stained with anti-CD4, anti-CD25 and anti-Foxp3 and analyzed by FACS. Treg expansion of CFSE-labeled CD4⁺CD25⁺ T-cells was determined by FACS analysis after 4 days of culture [3].

Western Blots

BMDCs were washed in cold PBS and resuspended in lysis buffer (Tris 50 mM, NaCl 0.15 M, DTT 1 mM, Triton X-100 1% (v/v) containing and protease and phosphatase inhibitors). Cells lysates were fractionated on 10% SDS-PAGE gels, transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond-ECL Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC) and incubated overnight with primary antibodies, followed by the appropriate secondary antibodies and revealed by enhanced chemiluminescence (GE Health Care Canada Inc., Oakville, ON).

EMSA and supershifts

BMDCs nuclear extracts were prepared as described [31]. For supershift experiments, reactions were performed in the presence of relevant antibodies, for 30 min at 4 °C, before the addition of the labeled oligonucleotide. The oligonucleotide containing tandemly repeated consensus NF- κ B was 5'-GATCAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCC-3'. In the case of AP-1 analysis, the oligonucleotide was 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3'. The nucleotides were from Promega (Madison, WI).

Chromatin immunoprecipitation assays (ChIP)

Chromatin immunoprecipitations were performed using EZ-ChIP kit, according to the manufacturer's protocol (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Sonicated chromatin (100 μ l/condition) were then immunoprecipitated with anti-p65 or with isotype-matched control IgG Abs coupled to microbeads. Samples were subjected to PCR amplification of the regions containing the proximal NF- κ B site in the promoters of IL-10 and IL-12p35. Primers were 5'-TAGAAGAGGGAGGAGGAGCC-3' (forward) and 5'-TGTGGCTTTGGTAGTGCAAG-3' (reverse) for the IL-10 promoter and 5'-CGACGCACTTGTCCTTGAGAT-3' (forward) and 5'-ACTGAGAGGAGCTGCTGGAT-3' (reverse) for the IL-12p35 promoter.

Statistical analysis

Comparisons between two groups were done using two-tailed unpaired Student's t-test. When more than two groups were compared, one-way ANOVA with post hoc Bonferroni's test were done. Differences were considered to be statistically significant for $p < 0.05$.

5.1.6 Results

Phenotype and cytokine profile of GM/DCs and IL-4/DCs

We have previously shown that a treatment of NOD mice with GM-CSF promoted the generation of tolerogenic smDCs that are required for protection against diabetes [4]. Here, we have generated BMDCs from diabetes-prone NOD mice using GM-CSF (GM/DCs) or a combination of GM-CSF and IL-4 (IL-4/DCs), and have characterized their phenotypes by flow cytometry. Results showed (Fig. 1A and B) that unstimulated GM/DCs and IL-4/DCs exhibited an immature phenotype as shown by low expression of CD80, CD86, CD40 and MHC-II. As previously reported [27], [28] and [29], LPS-stimulated IL-4/DCs exhibited a fully mature phenotype as shown by significant increases in expression of CD80, CD86, CD40 and MHC-II (MFI, 153 ± 59 , 203 ± 21 , 131 ± 7 and 120 ± 17 , respectively) as compared to unstimulated IL-4/DCs (MFI, 64 ± 8 , 61 ± 28 , 25 ± 2 and 48 ± 10 , respectively) (Fig. 1A and B). However, LPS-stimulated GM/DCs exhibited an immature-like phenotype as shown by a modest increase in expression of CD80 but not CD86, CD40 and MHC-II (MFI, 86 ± 34 , 22 ± 5 , 47 ± 6 and 43 ± 5 , respectively) as compared to unstimulated GM/DCs (MFI, 56 ± 14 , 25 ± 5 , 50 ± 38 and 51 ± 4 , respectively) (Fig. 1A and B). These results suggested that BMDCs of diabetes prone NOD mice generated with GM-CSF alone acquired a semimature phenotype whereas DCs generated with a combination of GM-CSF and IL-4 displayed a more mature phenotype. Furthermore, we found that LPS-stimulated GM/DCs possessed higher phagocytic activity (data not shown) and produced considerable amounts of IL-10 (Fig. 1C), but no IL-12p70 (Fig. 1D) or IFN γ (Fig. 1E) as compared to LPS-stimulated IL-4/DCs. Our data are in agreement with previous reports showing that smDCs exhibit greater phagocytic capacity and produce less inflammatory but more anti-inflammatory cytokines than fully mature DCs [2]. The differences in phenotype and function of GM/DCs and IL-4/DCs are not due to a variation in the levels of TLR4 expression since there were no significant differences of TLR4 expression between GM/DCs and IL-4/DCs (data not shown). These results suggest that GM/DCs from NOD mice behave as non-inflammatory smDCs, based on the findings of resistance to maturation, enhanced phagocytic capacity, large amount of IL-10 production, and low or absence of production of IL-12p70 and IFN γ .

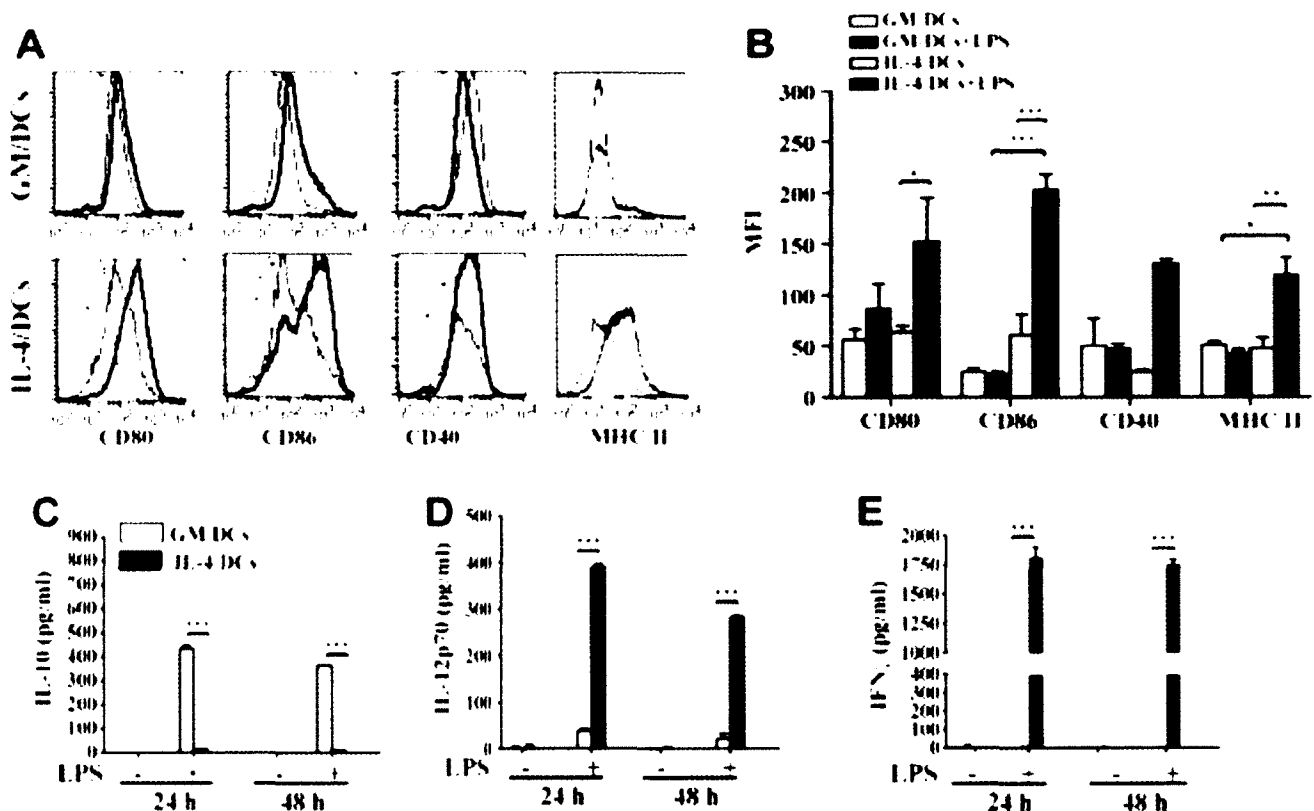


Fig. 1. Phenotype and cytokine production by bone marrow-derived GM/DCs and IL-4/DCs.

GM/DCs and IL-4/DCs derived from the bone marrow of NOD mice were harvested on day 7. Cells were left unstimulated or exposed to LPS (1 μ g/ml) for 24 h and 48 h. (A) Representative FACS profiles of CD80, CD86, CD40 and MHC-II markers. Solid thin lines represent staining of unstimulated DCs, solid thick lines represent staining of DCs stimulated with LPS (1 μ g/ml, 48 h) and dashed thin lines represent staining with isotype-matched control antibodies. (B) Mean fluorescence intensities (MFI) were quantified in each case and are shown as the mean \pm SD. The results are representative of 3 independent experiments. (C–E) Cytokines production. GM/DCs and IL-4/DCs (1×10^6 cells/ml) were stimulated with LPS (1 μ g/ml) for 24 h or 48 h, and IL-10 (C), IL-12p70 (D) and IFN γ (E) in the supernatants were quantified by ELISA. Unstimulated BMDCs were used as controls. Results are illustrative of 3 independent experiments and expressed as the mean \pm SD represented by the vertical bars. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

T-cell proliferation and cytokine production induced by GM/DCs

We next investigated the capacity of GM/DCs to induce the proliferation and cytokine production of H-2K^d-restricted diabetogenic 8.3-CD8⁺ T-cells. Unstimulated GM/DCs induced a proliferation of 8.3-CD8⁺ T-cells that was less than by unstimulated IL-4/DCs over a range of concentrations of auto-antigenic NRP-A7 mimotope (Fig. 2A). Interestingly, LPS-stimulated GM/DCs induced a weak proliferation of 8.3-CD8⁺ T-cells, in contrast to the robust proliferation triggered by unstimulated or LPS-stimulated IL-4/DCs (Fig. 2A). 8.3-CD8⁺ T-cells cultured in the presence of GM/DCs produced barely detectable amounts of IL-2 (Fig. 2B). In contrast, 8.3-CD8⁺ T-cells cultured in the presence of unstimulated or LPS-stimulated IL-4/DCs produced large amounts of IL-2 (Fig. 2B). Similarly, unstimulated GM/DCs were not able to induce 8.3-CD8⁺ T-cells to produce IFN γ in contrast to unstimulated IL-4/DCs (Fig. 2C). However, LPS-stimulated GM/DCs induced 8.3-CD8⁺ T-cells to produce IFN γ , although at levels significantly lower than those produced in the presence of LPS-stimulated IL-4/DCs (Fig. 2C). The same unstimulated GM/DCs loaded with low doses (0.0025–0.25 μ g/ml) of BDC2.5 mimotope 1040-31 induced a robust proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells (Fig. 2D). No difference was seen in the proliferation of CD4⁺CD25⁻ T with unstimulated or LPS-stimulated GM/DCs (Fig. 2D). IL-4/DCs induced also a higher proliferation of CD4⁺CD25⁻ T compared to GM/DCs (Fig. 2D)

In vitro Treg differentiation induced by GM/DCs

We have shown that BMDCs obtained from NOD mice and conditioned in vitro to become tolerogenic smDCs are able to induce the expansion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs and the differentiation of CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-cells into Tregs [3]. We therefore investigated whether LPS-stimulated GM/DCs also acquired these properties. Purified NOD splenic CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ T-cells were cultured in the presence of anti-CD3 and IL-2, in the absence or the presence of GM/DCs or IL-4/DCs of NOD mice. The expansion of Treg cells was determined by tracking the proliferation of CFSE-labeled CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-cells. Co-cultures performed in the absence or the presence of unstimulated or LPS-stimulated IL-4/DCs did not induce the proliferation of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-cells (Fig. 2E). In contrast, co-cultures performed in the

presence of unstimulated or LPS-stimulated GM/DCs induced a robust proliferative response of Tregs (Fig. 2E).

We next investigated the capacity of GM/DCs and IL-4/DCs of NOD mice to induce the conversion of CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-cells into CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs. The combination of anti-CD3 and IL-2 did not induce expression of Foxp3⁺ T-cells (data not shown). Unstimulated GM/DCs or IL-4/DCs induced a moderate ($4.50 \pm 0.23\%$ and $5.30 \pm 0.05\%$, respectively) but significant increased percentage of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-cells, relative to a marginal increase of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-cells in the co-culture in the presence of LPS-activated GM/DCs ($0.65 \pm 0.25\%$) after 4 days of co-cultures (Fig. 2F). Importantly, the percentage of converted CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-cells was strongly increased after 7 days of co-culture in the presence of unstimulated GM/DCs ($11.11 \pm 0.81\%$) as compared to all other culture conditions (Fig. 2G). However, when the CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-cells were co-cultured with LPS-activated GM/DCs or LPS-activated IL-4/DCs, only LPS-activated IL-4/DCs induced a moderate increase in the percentage of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-cells after 4 or 7 days ($4.05 \pm 1.41\%$ and $7.84 \pm 0.93\%$, respectively) (Fig. 2F and G).

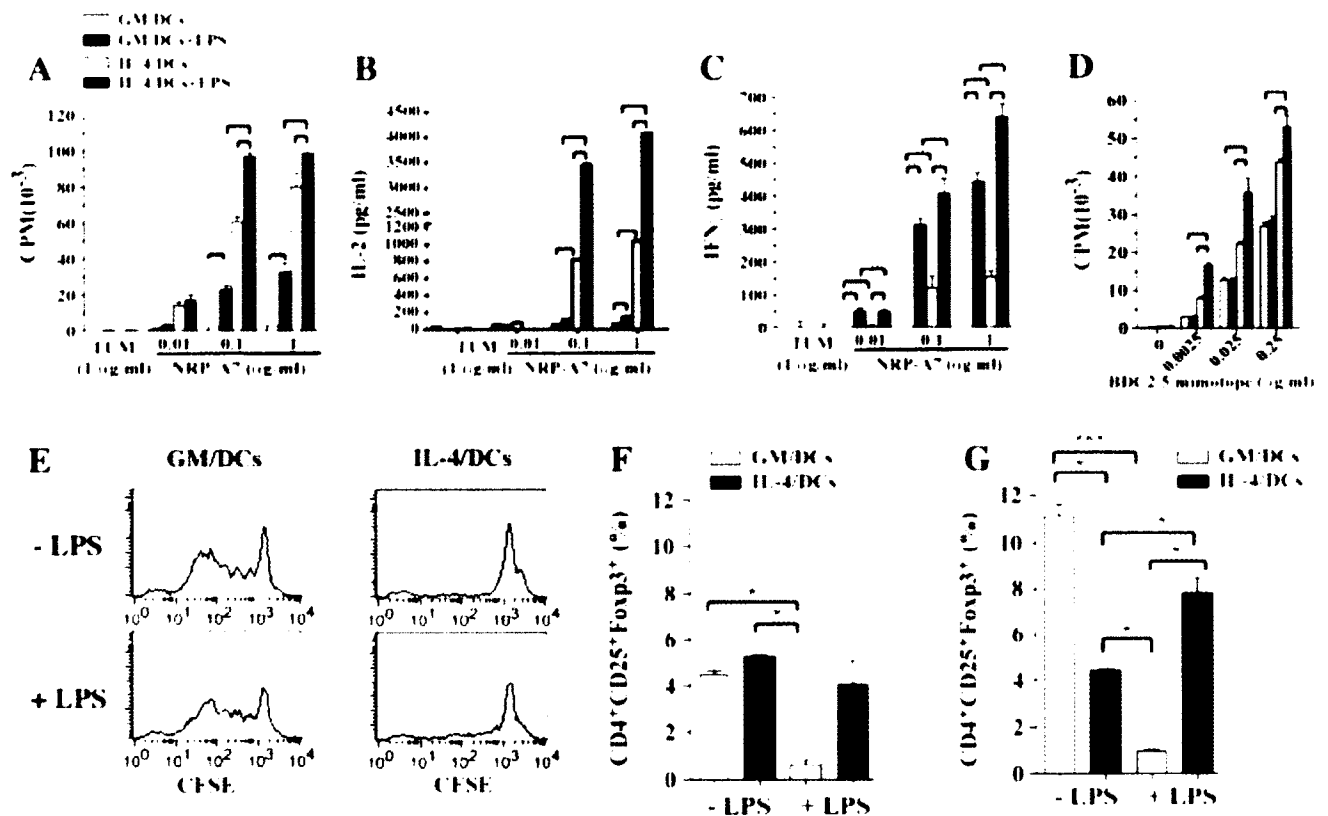


Fig. 2. GM/DCs of NOD mice exhibit a decreased capacity to stimulate 8.3-CD8⁺ T-cells and greater capacity to induce Treg differentiation.

NOD GM/DCs and IL-4/DCs (5×10^3 cells/well) were pulsed with increasing concentrations of the NRP-A7 peptide and cultured with 8.3-CD8⁺ T-cells (2×10^4) for 72 h. BMDCs pulsed with the irrelevant TUM peptide (1 μ g/ml) were used as a control. The proliferative response was measured by [³H]-thymidine incorporation. The amounts of IL-2 (B) and IFN γ (C) produced by 8.3-CD8⁺ T-cells stimulated with peptide-pulsed BMDCs for 48 h were determined by ELISA assays. (D) Proliferation of BDC2.5 CD4⁺CD25⁻ T cells after stimulation with BDC2.5 mimotope, presented by GMDCs or IL-4/DC. For Treg expansion, purified GM/DCs and IL-4/DCs were co-cultured for 4 days with purified CFSE-stained CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-cells from NOD mice. CFSE-based T-cell proliferations were monitored by FACS (E). For Treg conversion, purified CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-cells from NOD mice were cultured in the presence of BMDCs for 4 (F) or 7 (G) days. Conversion was confirmed by expression of the CD25 and Foxp3 markers. Data illustrative of 3 independent experiments are shown as the average \pm SD. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Role of ERK1/2 and AP-1 in regulating maturation and cytokine production by GM/DCs

To gain insight of molecular mechanisms involved in the maturation and function of BMDCs we first analyzed the levels of activation of ERK1/2. Activated ERK1/2 MAP kinase has been shown to be involved in the production of IL-10 as well as the survival of BMDCs [12] and [20]. Western Blots analysis of ERK1/2 revealed high levels of phosphorylation in unstimulated GM/DCs as well as in IL-4/DCs (Fig. 3A). However, ERK1/2 phosphorylation was significantly reduced in IL-4/DCs but was maintained in GM/DCs after 48 h of stimulation with LPS (Fig. 3A). To further examine the role of ERK1/2 on the phenotype and the functions of GM/DCs, the cells were exposed to U0126 (10 μ M), a highly selective inhibitor of MEK1/2, prior to stimulation with LPS. A first series of experiments revealed that U0126 had no effect on DCs viability as compared to LPS-stimulated DCs but as expected it abolished the phosphorylation of ERK1/2 in LPS-stimulated GM/DCs (data not shown). We next investigated whether inhibition of MEK1/2 affected the phenotype of LPS-stimulated GM/DCs. Results showed no changes in the levels of expression of CD80, CD86 and CD40 of LPS-stimulated GM/DCs, whether the cells had been exposed to U0126 or to the vehicle (DMSO) (Fig. 3B). ERK1/2 MAP kinase has been shown to be involved in the production of IL-10 and the survival of BMDCs [12] and [20]. In addition, IL-10 produced by tolerogenic DCs is thought to be responsible for the inhibition of DC maturation. Therefore, we quantified the production of IL-10 and IL-12p70 by GM/DCs under the conditions of MEK1/2 inhibition. There was a drastic reduction of IL-10 production by LPS-stimulated GM/DCs incubated with U0126 compared to LPS-stimulated GM/DCs incubated with the vehicle (Fig. 3C). Furthermore, LPS-stimulated GM/DCs exposed to U0126 produced large amounts of IL-12p70 as compared to LPS-stimulated GM/DCs controls (Fig. 3D). The levels of IL-12p70 were similar to those of LPS-stimulated IL-4/DCs (Fig. 1D). We next determine whether the effect of MEK1/2 inhibitor U0126 on IL-12p70 production was mediated through inhibition of IL-10 production. To test this possibility, GM/DCs from NOD mice were left unstimulated or stimulated with LPS in the presence or in the absence of an anti-IL-10 blocking Ab and their production of IL-12p70 was quantified by ELISA. Results showed, a 3 to 4-fold increase of IL-12p70 production in the presence of U0126 (Fig. 3E). This value increased to 16-fold when the neutralizing anti-IL-10 Ab was added to the culture medium. Similarly, IL-10^{-/-}GM/DCs (generated from NOD.IL-10^{-/-} mice) produced 3–4 times more of IL-12p70 than

what is produced by GM/DCs (Fig. 3E and F). In addition, IL-10^{-/-}GM/DCs stimulated in the presence of U0126 showed a 16-fold increase of IL-12p70 production (Fig. 3F). These results suggested that ERK phosphorylation acted as negative regulator of IL-12p70 production through an IL-10-dependent as well as an IL-10 independent mechanism.

Since AP-1 transcription factor is an important mediator downstream of MAPK pathway that controls the synthesis of IL-10 [32], we investigated DNA binding activity of AP-1 in GM/DCs and IL-4/DCs. Results showed that the DNA binding activity of AP-1 was higher in LPS-stimulated GM/DCs than in LPS-stimulated IL-4/DCs (Fig. 3G). Interestingly, DNA binding activity of AP-1 was induced earlier in GM/DCs (1 h after LPS-stimulation) as compared to IL-4/DCs (4 h after LPS-stimulation) and a maximum binding was detected 8 h after LPS stimulation in GM/DCs and IL-4/DCs (Fig. 3G). The AP1 binding activity remains persistent 48 h after LPS stimulation in the case of GM/DCs whereas it was drastically lost in the case of IL-4/DCs (Fig. 3G). To explore whether ERK regulates AP-1 binding activity in tolerogenic GM/DCs, we pretreated GM/DCs with U0126 and analyzed AP-1 DNA binding activity. We found that AP-1 DNA binding activity was drastically reduced in LPS-stimulated GM/DCs exposed to U0126 (Fig. 3H).

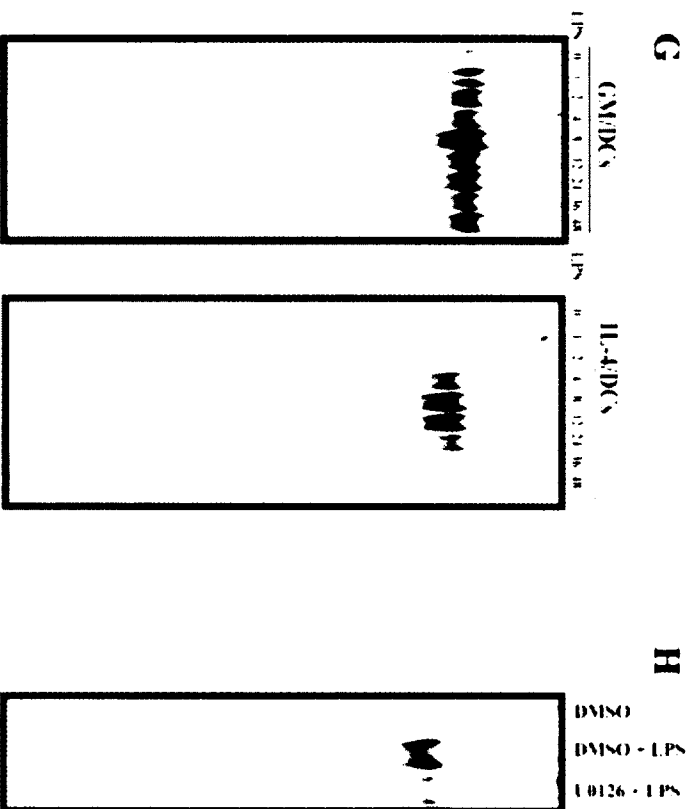
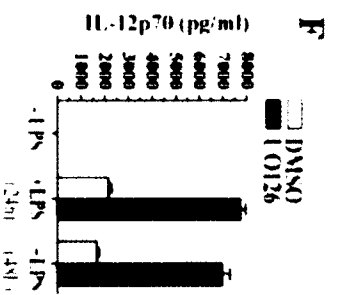
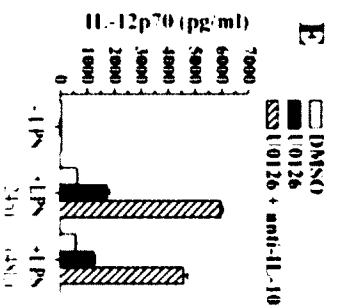
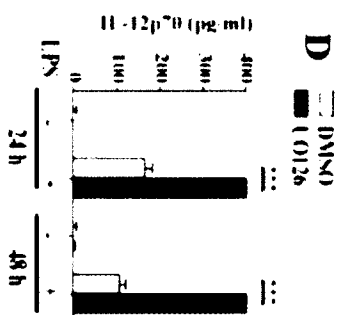
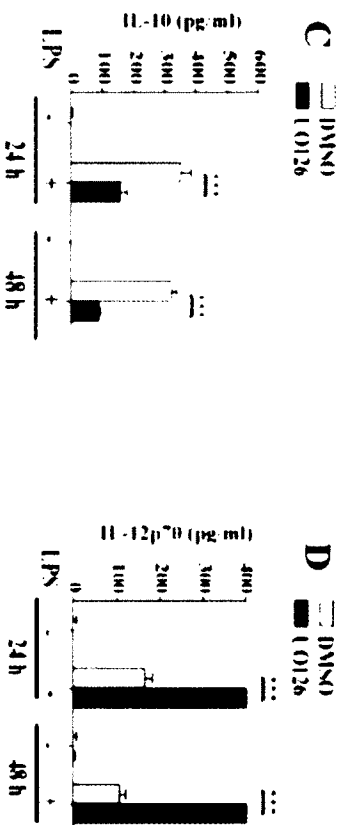
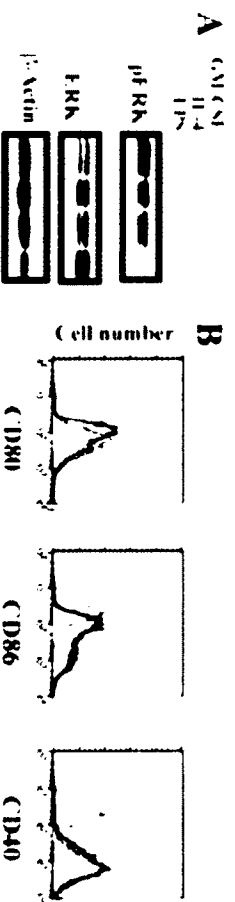


Fig. 3. ERK activation is responsible for the preferential increased production of IL-10 by GM/DCs.

(A) GM/DCs and IL-4/DCs were left untreated or stimulated with LPS (1 μ g/ml) for 48 h. ERK1/2 activation was assessed by Western Blots using anti-pERK1/2 or anti-ERK1/2 antibodies. β -Actin was used as control of gel loading. (B) GM/DCs were pre-incubated with vehicle (DMSO, solid thin lines) or with U0126 MEK1/2 inhibitor (solid thick lines) prior to LPS stimulation, then stained with antibodies directed against CD80, CD86 and CD40 and analyzed by FACS. GM/DCs stained with isotype control antibodies were used as control (dashed thin lines). (C and D) GM/DCs were pre-treated with U0126 (10 μ M), exposed to LPS (1 μ g/ml) for 24 or 48 h and IL-10 and IL-12p70 production in the supernatants were measured by ELISA assays. (E) GM/DCs were pre-treated with U0126 (10 μ M), exposed to LPS (1 μ g/ml) for 24 or 48 h in the absence or in the presence of an anti-IL-10 Ab (10 μ g/ml), and IL-12p70 production was measured by ELISA. (F) GM/DCs generated from NOD.IL-10^{-/-} mice (IL-10^{-/-}GM/DCs) were pre-incubated with U0126 (10 μ M) or DMSO, exposed to LPS (1 μ g/ml) for 24 h and 48 h and the amounts of IL-12p70 in the supernatants were measured by ELISA. (G) Nuclear extracts of GM/DCs and IL-4/DCs stimulated with LPS at indicated times were used for EMSA assay with a probe containing the AP-1 DNA binding site. (H) Nuclear extracts of GM/DCs that had been preincubated with U0126 or DMSO and stimulated with LPS for 48 h were used for EMSA assay with a probe containing the AP-1 DNA binding site. A representative data of 3 independent experiments is shown. In the case of cytokines, results are shown as the mean \pm SD. (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

Role of NF- κ B in the regulation of the phenotype and the functions of GM/DCs

It has been reported that NF- κ B plays a key role in regulating the APC functions of DCs, and that a persistent nuclear translocation and transcriptional activity of NF- κ B contributed to high production of IL-12p70 in IL-4/DCs of NOD mice [27] and [28]. We therefore investigated the kinetic of NF- κ B activation in GM/DCs and IL-4/DCs of NOD mice. Results of EMSA experiments showed similar upregulation of DNA-binding activity of NF- κ B in GM/DCs and in IL-4/DCs that was sustained for up to 48 h following LPS stimulation (Fig. 4A). Interestingly, Western blot analysis showed a rapid and total degradation of I κ B α at 4 h, followed by re-synthesis at 8 h in LPS-stimulated GM/DCs. These results contrasted with the rapid and partial degradation and fast de novo synthesis at 4 h in LPS-stimulated IL-4/DCs (Figs. 4A). This unexpected enhanced NF- κ B signaling in tolerogenic GM/DCs led us to examine the composition of the respective NF- κ B complexes that were involved. Supershift analysis using individual NF- κ B subunits-specific Abs indicated that after 1 or 8 h of LPS activation, NF- κ B complexes contained the p65 subunit (possibly homodimer) in GM/DCs. In contrast, NF- κ B complexes containing p52, p65 and RelB subunits were found in IL-4/DCs (Fig. 4B and Fig. 4C). Interestingly, the LPS-induced DNA binding of complexes containing the suspected p65 homodimer in GM/DCs of NOD mice was substituted by the complexes containing p52 and p65 after 48 h of stimulation with LPS. In the case of IL-4/DCs, supershift analysis revealed that NF- κ B complexes containing p52, p65 and RelB remained unchanged up to 48 h after LPS stimulation (Fig. 4C).

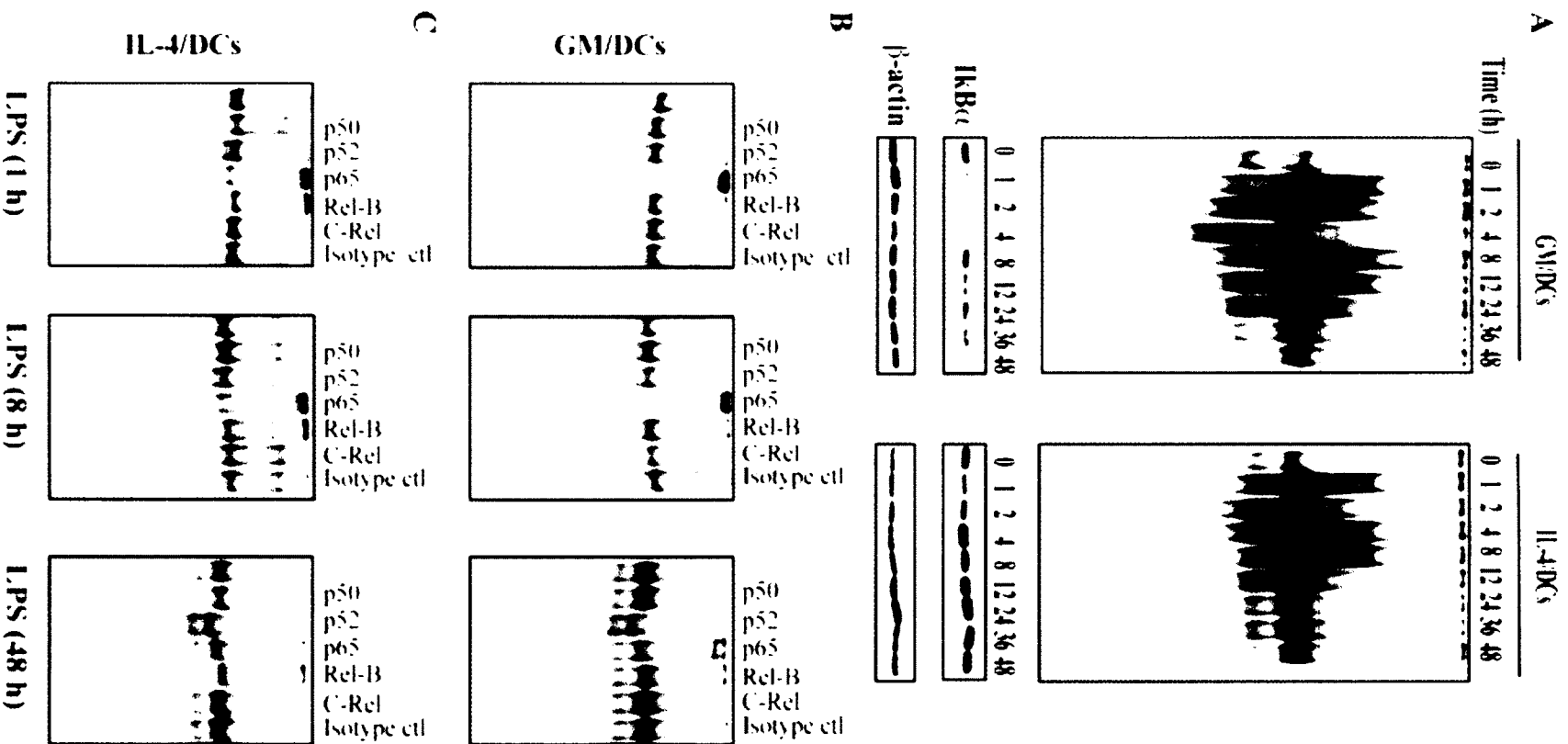


Fig. 4. Analysis of NF- κ B DNA binding activity in LPS-stimulated GM/DCs and IL-4/DCs.

GM/DCs and IL-4/DCs were stimulated with LPS (1 μ g/ml) for various periods of time, as indicated. (A) Nuclear extracts were prepared and DNA binding activity of NF- κ B subunits was analyzed by EMSA. Cytoplasmic extracts were analyzed by Western Blots using an anti-I κ B α antibody. Membranes were probed for β -actin as gel loading control. (B and C) DNA binding activity of subunits of the NF- κ B were determined using supershift assays. Data are representative of 2–3 independent experiments.

We next investigated whether the p65 subunit was recruited to the IL-10 and/or IL-12p35 promoters in GM/DCs and IL-4/DCs. Chromatin immunoprecipitations (ChIP) were done using a p65 antibody and PCR amplifications were performed using primers for IL-10 and IL-12p35 promoters. Results showed that the p65 was recruited to IL-10 promoter following LPS treatment of GM/DCs (Fig. 5A). Surprisingly, p65 was also recruited to IL-10 promoter in unstimulated and LPS-stimulated IL-4/DCs (Fig. 5A). The recruitment of p65 to the IL-10 promoter was slightly increased in LPS-stimulated GM/DCs as compared to unstimulated or LPS-stimulated IL-4/DCs (Fig. 5A). Since MEK1/2 inhibitor U0126 blocks IL-10 production by GM/DCs, we determine whether the inhibitor U0126 blocks p65 recruitment to IL-10 promoter. Results showed that p65 recruitment to IL-10 promoter was not affected by U0126 in LPS-stimulated GM/DCs suggesting that NF- κ B and ERK1/2 are involved in IL-10 transcription (Fig. 5B). In contrast, an increased recruitment of p65 to IL-12p35 promoter was observed in IL-4/DCs but not in LPS-stimulated GM/DCs (Fig. 5C).

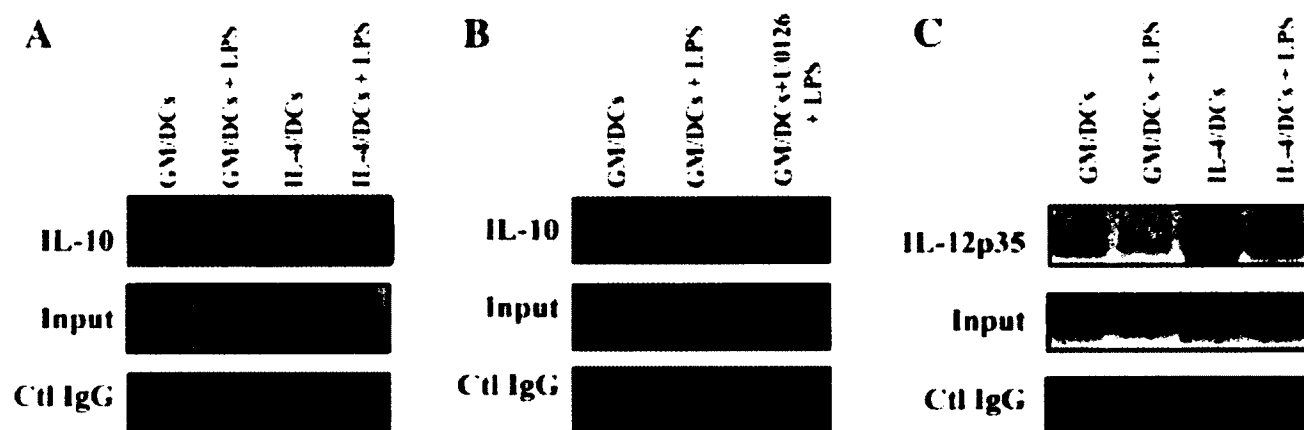


Fig. 5. Analysis of p65 NF- κ B subunit binding to IL-10 and IL-12p35 promoter in GM/DCs and IL-4/DCs.

BMDCs were preincubated with U0126 (10 μ M) or DMSO and stimulated with LPS (1 μ g/ml) for 8 h. DNA present in DNA-protein complexes immunoprecipitated with an anti-p65 antibody or isotype IgG control were amplified by PCR using primers for IL-10 (A and B) and IL-12p35 (C) promoters. Data are representative of 2 independent experiments.

5.1.7 Discussion

We have presented evidence that GM/DCs generated from NOD mice acquired the phenotype and functional signature of immunoregulatory DCs. In contrast to IL-4/DCs, GM/DCs produced large amounts of IL-10 and small quantities of IL-12p70 and IFN γ . GM/DCs also induced a weak proliferation of diabetogenic CD8⁺ T-cells, induced Treg expansion and promoted a more efficient conversion of naive CD4⁺ T-cells into Tregs than IL-4/DCs. The analysis of the mechanisms underlying the immunoregulatory functions of GM/DCs indicated that the increased production of IL-10 and the reduced production of IL-12 were dependent on ERK1/2 phosphorylation, which correlated with AP-1 activation. In contrast, the maturation stage of GM/DCs was independent of ERK1/2 activation. Similarly to IL-4/DCs, we found enhanced activation of NF- κ B in GM/DCs of NOD mice. However, unlike IL-4/DCs, RelB was no longer a constituent of the NF- κ B complex in GM/DCs. ChIP analyses revealed that the NF- κ B subunit p65 bound to the IL-10 promoter in LPS-stimulated GM/DCs and IL-4/DCs, whereas it bound to the IL-12-p35 promoter in unstimulated GM/DCs and IL-4/DCs and in LPS-stimulated IL-4/DCs.

Similar to NOD mice, it has been reported that in diabetic patients abnormalities such as maturation and antigen presentation defect could contribute to autoimmune beta cell destruction [33] and [34]. Interestingly, a recent work has shown that human bone marrow cells, when cultured with GM-CSF alone, give rise to immature DC that did not upregulate surface markers and remained functionally immature upon maturation [35]. For example, DCs from NOD mice adopt an exaggerated mature phenotype and display a hyperactivated NF- κ B pathway under inflammatory conditions [27], [28] and [29]. Consequently, they produce more inflammatory cytokines (such as IL-12, TNF α and IFN γ) than anti-inflammatory cytokines (such as IL-10 and TGF β). These conditions lead to a Th1 immune response and/or a defect in inducing and maintaining a Treg pool [36] and [37].

There is emerging evidence that experimental manipulation of DCs to induce their acquisition of immunoregulatory properties is effective for therapeutic intervention in autoimmunity [3] and [4] and in prevention of graft rejection [18]. Since autoimmune diseases can be mediated either by Th1 (e.g. T1D, thyroiditis) or Th2 (e.g. allergy and asthma) responses that are triggered by DCs, it is critical to decipher the molecular mechanisms involved in DC maturation and function in

order to design safe clinical applications. We have previously reported that treatment of NOD mice with GM-CSF induced myeloid DCs to acquire immunoregulatory function and that these immunoregulatory DCs were required for Treg expansion and protection from diabetes [4]. To further delineate the mechanisms involved in regulating DCs phenotype and function, we generated BMDCs from NOD mice using GM-CSF or GM-CSF and IL-4. We found that GM/DCs displayed a semimature phenotype, whereas IL-4/DCs adopt a more mature phenotype. Consistent with earlier reports [27] and [38], LPS-stimulated IL-4/DCs of NOD mice had a more mature phenotype, produced more IL-12p70 and IFN γ (but no IL-10), and had an enhanced ability to stimulate antigen-specific diabetogenic CD8 $^{+}$ T-cells than IL-4/DCs. Importantly, GM/DCs of NOD mice behaved as immunoregulatory DCs generated by treatment of BMDCs progenitors with a low dose of GM-CSF [35] and [39]. Indeed, GM/DCs from NOD mice produced large quantities of IL-10, very low amounts of IL-12p70 and IFN γ and were poor CD8 $^{+}$ T-cells activators. Furthermore, GM/DCs were also capable of expanding pre-existing Tregs and inducing more efficiently the conversion of naïve CD4 $^{+}$ T-cells into Tregs as compared to IL-4/DCs. These results are in agreement with our previous reports, which showed the capacity of smDCs to induce Treg differentiation, in vitro and in vivo [3] and [4]. Interestingly, IL-4/DCs generated from bone marrow cells of GM-CSF-treated NOD mice behave as GM/DCs since they retain their immunoregulatory properties [40]. Together, these results suggest an important role of GM-CSF in the induction of immunoregulatory DCs functions in vivo and in vitro.

The underlying molecular mechanisms regulating GM/DCs phenotype and function in NOD mice are not fully understood. Because GM/DCs produce greater amounts of IL-10, it is likely that autocrine IL-10 prevents their maturation and influenced their function as previously reported [5]. Taking in account that induction of IL-10 has been linked to the activation of ERK1/2 MAPK and that the activation of ERK1/2 has also been associated with inhibition of IL-12 production [32] and [41], we determined the contribution of ERK1/2 to immunoregulatory GM/DCs phenotype and functions. We found that immunoregulatory GM/DCs of NOD mice had increased and sustained activation of ERK1/2 that correlated with enhanced IL-10 production and low IL-12p70 production and induced better Treg differentiation. MEK1/2 inhibition reduced the production of IL-10 by approximately 50% and enhanced production of IL-12p70 but had no effect on the phenotype of GM/DCs. These results suggested that ERK activation was necessary but not sufficient for IL-10 production and that the maturation stage and cytokine production

profile of DCs were controlled by at least two distinct signaling pathways. Inhibition of MEK1/2 also inhibited the DNA-binding activity of AP-1 that is involved in the transcription of the IL-10 gene [32] and [42]. In agreement with our results, c-fos-deficient DCs have been shown to produced more IL-12p70 and to have a reduced secretion of IL-10 [32]. Furthermore, DCs expressing constitutively active ERK1/2 and IRF3 induced IL-10 secretion and the expansion of Tregs [23]. Therefore, we cannot exclude the contribution of other signaling pathways, which have been implicated in the production of IL-10 and its contribution to the immunoregulatory functions of DCs.

Previous reports have shown that functional defects in myeloid IL-4/DCs generated from bone marrow and spleen of NOD mice correlated with enhanced NF- κ B activation, resulting in enhanced APC function [27], [28] and [29]. In agreement with these reports, we found a strong activation of NF- κ B in IL-4/DCs of NOD mice. Unexpectedly, we found similar activation of the NF- κ B signaling pathways in immunoregulatory GM/DCs. We suggest that the differential association of NF- κ B subunits is determining event in the modulation of phenotypes and immune functions (cytokines production and T-cell activation) of bone marrow-derived GM/DCs and IL-4/DCs from NOD mice.

Several lines of evidence have indicated that RelB is the primary NF- κ B constituent involved in DC maturation [18] and [19]. RelB-deficient BMDCs did not express CD40, expressed low levels of MHC-II and CD86, and induced Treg differentiation in an antigen-specific manner [19]. It has also been reported that RelB-silent DCs expressed cell surface markers similar to immunoregulatory DCs, induced Treg differentiation, and prevented heart allograft rejection [18]. Our results showed for the first time that RelB was not a part of NF- κ B complex in immunoregulatory GM/DCs of NOD mice whereas RelB was consistently found in the NF- κ B DNA-binding complex of IL-4/DCs. The absence of RelB in the NF- κ B complex in GM/DCs correlated with low levels of costimulatory markers, their low capacity to activate CD8⁺ T-cells and the increased induction of Treg differentiation. In agreement with our findings, RelB has been found increased in IL-4/DCs of NOD mice [27]. Since RelB was associated with DC maturation but not with cytokines secretion, it is possible that differential recruitment of NF- κ B complexes containing p65 to cytokines promoters allows fine tuning of IL-10 and IL-12p70 production by GM/DCs and IL-4/DCs, respectively. Our results suggest that the absence of RelB

from the NF- κ B complex in GM/DCs plays an important role in triggering their immunoregulatory function in NOD mice since enhanced recruitment of NF- κ B complexes containing p65 to the IL-10 promoter was seen in LPS-stimulated GM/DCs and in IL-4/DCs whereas its recruitment to the IL-12p35 promoter was more pronounced in IL-4/DCs. Since NF- κ B complexes containing p65 were different in GM/DCs and IL-4/DCs, it is conceivable that in IL-4/DCs, NF- κ B complex containing p65 and perhaps p52 and RelB are recruited to the IL-10 promoter without affecting IL-10 transcription. In contrary, when recruited to IL-12 promoter it promotes transcription of IL-12. In agreement with this interpretation, it has been shown that translocation of p52 and RelB in mature DCs but not immature DCs whereas translocation of p65 occurs in immature and mature DCs [43]. In this connection, it has been reported that various NF- κ B complexes with distinct target gene specificities were differentially expressed in B-lineage cells [44] and [45]. In addition, Koga et al. have reported that c-Fos can interact with the p65 subunit to reduce its capacity to bind to pro-inflammatory cytokines promoters [46]. Therefore, it is likely that the sustained activation of ERK1/2 in GM/DCs induced the phosphorylation of c-Fos which interacts with p65 and that leads to a reduction of production of IL-12 but an increased production of IL-10.

Overall, our results showed that GM-CSF induced the generation of immunoregulatory DCs that acquired a semimature phenotype and induced Treg differentiation. Our data further suggested that modulating DCs phenotype and function by targeting the DNA binding of RelB, p65 and/or the ERK1/2 activity in DCs could represent an attractive therapeutic strategy to prevent type 1 diabetes and that finding may apply to other autoimmune diseases.

5.1.8 Acknowledgments

We thank Dr. P. Santamaria for reagents and mice. We also thank J.N. Silvestro and J. Cayer for animal care and technical assistance.

This work was supported by a grants to A.A. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Juvenile Diabetes Foundation International and from CIHR to P.P.Mc.D. C.G. and M.M. were recipients of summer studentships from Diabetes Québec. C.G. and S.G. are the recipients of PhD Studentships from the CIHR. A.A. is the recipient of a Canadian Diabetes Association New Investigator Award, and of a Chercheur-boursier Junior 2 Scholarship from the

5.1.9 References

- [1] A. Lanzavecchia, F. Sallusto The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics *Curr Opin Immunol*, 13 (2001), pp. 291–298
- [2] M.B. Lutz, G. Schuler Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity *Trends Immunol*, 23 (2002), pp. 445–449
- [3] G. Besin, S. Gaudreau, M. Menard, C. Guindi, G. Dupuis, A. Amrani TSLP and TSLP-conditioned dendritic cells induce Treg differentiation and protection of NOD mice against diabetes *Diabetes* (2008)
- [4] S. Gaudreau, C. Guindi, M. Menard, G. Besin, G. Dupuis, A. Amrani Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prevents diabetes development in NOD mice by inducing tolerogenic dendritic cells that sustain the suppressive function of CD4+CD25+ regulatory T cells *J Immunol*, 179 (2007), pp. 3638–3647
- [5] S. Corinti, C. Albanesi, A. la Sala, S. Pastore, G. Girolomoni Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions *J Immunol*, 166 (2001), pp. 4312–4318
- [6] T. De Smedt, M. Van Mechelen, G. De Becker, J. Urbain, O. Leo, M. Moser Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function *Eur J Immunol*, 27 (1997), pp. 1229–1235
- [7] K. Steinbrink, M. Wolfl, H. Jonuleit, J. Knop, A.H. Enk Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells *J Immunol*, 159 (1997), pp. 4772–4780
- [8] D. Hawiger, K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J.V. Ravetch, R.M. Steinman, M.C. Nussenzweig Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo *J Exp Med*, 194 (2001), pp. 769–779
- [9] P. Verginis, H.S. Li, G. Carayanniotis Tolerogenic semimature dendritic cells suppress experimental autoimmune thyroiditis by activation of thyroglobulin-specific CD4+CD25+ T cells *J Immunol*, 174 (2005), pp. 7433–7439
- [10] L. Burkly, C. Hession, L. Ogata, C. Reilly, L.A. Marconi, D. Olson, R. Tizard, R. Cate, D. Lo Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells *Nature*, 373 (1995), pp. 531–536
- [11] F. Ouaz, J. Arron, Y. Zheng, Y. Choi, A.A. Beg Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits *Immunity*, 16 (2002), pp. 257–270
- [12] M. Rescigno, M. Martino, C.L. Sutherland, M.R. Gold, P. Ricciardi-Castagnoli Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways *J Exp Med*, 188

(1998), pp. 2175–2180

[13] L. Wu, A. D'Amico, K.D. Winkel, M. Suter, D. Lo, K. Shortman RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells *Immunity*, 9 (1998), pp. 839–847

[14] C.E. Loscher, E. Draper, O. Leavy, D. Kelleher, K.H. Mills, H.M. Roche Conjugated linoleic acid suppresses NF-kappa B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction *J Immunol*, 175 (2005), pp. 4990–4998

[15] A. Puig-Kroger, M. Relloso, O. Fernandez-Capetillo, A. Zubiaga, A. Silva, C. Bernabeu, A.L. Corbi Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells *Blood*, 98 (2001), pp. 2175–2182

[16] G. Xiao, A.B. Rabson, W. Young, G. Qing, Z. Qu Alternative pathways of NF-kappaB activation: a double-edged sword in health and disease *Cytokine Growth Factor Rev*, 17 (2006), pp. 281–293

[17] S. Beinke, S.C. Ley Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology *Biochem J*, 382 (2004), pp. 393–409

[18] M. Li, X. Zhang, X. Zheng, D. Lian, Z.X. Zhang, W. Ge, J. Yang, C. Vladau, M. Suzuki, D. Chen, R. Zhong, B. Garcia, A.M. Jevnikar, W.P. Min Immune modulation and tolerance induction by RelB-silenced dendritic cells through RNA interference *J Immunol*, 178 (2007), pp. 5480–5487

[19] E. Martin, B. O'Sullivan, P. Low Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10 *Immunity*, 18 (2003), pp. 155–167

[20] A. Agrawal, S. Dillon, T.L. Denning, B. Pulendran ERK1-/- mice exhibit Th1 cell polarization and increased susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis *J Immunol*, 176 (2006), pp. 5788–5796

[21] C. Qian, X. Jiang, H. An, Y. Yu, Z. Guo, S. Liu, H. Xu, X. Cao LR agonists promote ERK-mediated preferential IL-10 production of regulatory dendritic cells (diffDCs), leading to NK-cell activation *Blood*, 108 (2006), pp. 2307–2315

[22] K. Sato, H. Nagayama, K. Tadokoro, T. Juji, T.A. Takahashi Extracellular signal-regulated kinase, stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, and p38mapk are involved in IL-10-mediated selective repression of TNF-alpha-induced activation and maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells *J Immunol*, 162 (1999), pp. 3865–3872

[23] D. Escors, L. Lopes, R. Lin, J. Hiscott, S. Akira, R.J. Davis, M.K. Collins Targeting dendritic cell signaling to regulate the response to immunization *Blood*, 111 (2008), pp. 3050–

- [24] Z.U. Mollah, S. Pai, C. Moore, B.J. O'Sullivan, M.J. Harrison, J. Peng, K. Phillips, J.B. Prins, J. Cardinal, R. Thomas Abnormal NF- κ B function characterizes human Type 1 diabetes dendritic cells and monocytes *J Immunol*, 180 (2008), pp. 3166–3175
- [25] D.V. Serreze, H.R. Gaskins, E.H. Leiter Defects in the differentiation and function of antigen presenting cells in NOD/Lt mice *J Immunol*, 150 (1993), pp. 2534–2543
- [26] M. Feili-Hariri, P.A. Morel Phenotypic and functional characteristics of BM-derived DC from NOD and non-diabetes-prone strains *Clin Immunol*, 98 (2001), pp. 133–142
- [27] B. Poligone, D.J. Weaver Jr., P. Sen, A.S. Baldwin Jr., R. Tisch Elevated NF- κ B activation in nonobese diabetic mouse dendritic cells results in enhanced APC function *J Immunol*, 168 (2002), pp. 188–196
- [28] D.J. Weaver Jr., B. Poligone, T. Bui, U.M. Abdel-Motal, A.S. Baldwin Jr., R. Tisch Dendritic cells from nonobese diabetic mice exhibit a defect in NF- κ B regulation due to a hyperactive I κ B kinase *J Immunol*, 167 (2001), pp. 1461–1468
- [29] W. Wheat, R. Kupfer, D.G. Gutches, G.R. Rayat, J. Beilke, R.I. Scheinman, D.R. Wegmann Increased NF- κ B activity in B cells and bone marrow-derived dendritic cells from NOD mice *Eur J Immunol*, 34 (2004), pp. 1395–1404
- [30] K. Inaba, M. Inaba, M. Naito, R.M. Steinman Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo *J Exp Med*, 178 (1993), pp. 479–488
- [31] C. Thompson, A. Cloutier, Y. Bosse, C. Poisson, P. Larivee, P.P. McDonald, J. Stankova Signaling by the cysteinyl-leukotriene receptor 2. Involvement in chemokine gene transcription *J Biol Chem*, 283 (2008), pp. 1974–1984
- [32] S. Dillon, A. Agrawal, T. Van Dyke, G. Landreth, L. McCauley, A. Koh, C. Maliszewski, S. Akira, B. Pulendran A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells *J Immunol*, 172 (2004), pp. 4733–4743
- [33] A. Jansen, M. van Hagen, H.A. Drexhage Defective maturation and function of antigen-presenting cells in type 1 diabetes *Lancet*, 345 (1995), pp. 491–492
- [34] K. Takahashi, M.C. Honeyman, L.C. Harrison Impaired yield, phenotype, and function of monocyte-derived dendritic cells in humans at risk for insulin-dependent diabetes *J Immunol*, 161 (1998), pp. 2629–2635
- [35] T.G. Berger, H. Schulze-Koops, M. Schafer, E. Muller, M.B. Lutz Immature and maturation-resistant human dendritic cells generated from bone marrow require two stimulations

to induce T cell anergy in vitro PLoS One, 4 (2009), p. e6645

[36] S.P. Berzins, E.S. Venanzi, C. Benoist, D. Mathis T-cell compartments of prediabetic NOD mice Diabetes, 52 (2003), pp. 327–334

[37] S. You, M. Belghith, S. Cobbold, M.A. Alyanakian, C. Gouarin, S. Barriot, C. Garcia, H. Waldmann, J.F. Bach, L. Chatenoud Autoimmune diabetes onset results from qualitative rather than quantitative age-dependent changes in pathogenic T-cells Diabetes, 54 (2005), pp. 1415–1422

[38] J. Morin, B. Faideau, M.C. Gagnerault, F. Lepault, C. Boitard, S. Boudaly Passive transfer of flt-3L-derived dendritic cells delays diabetes development in NOD mice and associates with early production of interleukin (IL)-4 and IL-10 in the spleen of recipient mice Clin Exp Immunol, 134 (2003), pp. 388–395

[39] M.B. Lutz, R.M. Suri, M. Niimi, A.L. Ogilvie, N.A. Kukutsch, S. Rossner, G. Schuler, J.M. Austyn Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo Eur J Immunol, 30 (2000), pp. 1813–1822

[40] S. Gaudreau, C. Guindi, M. Menard, A. Benabdallah, G. Dupuis GM-CSF induces bone marrow precursors of NOD mice to skew into tolerogenic dendritic cells that protect against diabetes Cell Immunol, 265 (2010), pp. 31–36

[41] A.K. Yi, J.G. Yoon, S.J. Yeo, S.C. Hong, B.K. English, A.M. Krieg, Role of mitogen-activated protein kinases in CpG DNA-mediated IL-10, IL-12 production: central role of extracellular signal-regulated kinase in the negative feedback loop of the CpG DNA-mediated Th1 response J Immunol, 168 (2002), pp. 4711–4720

[42] Z.Y. Wang, H. Sato, S. Kusam, S. Sehra, L.M. Toney, A.L. Dent Regulation of IL-10 gene expression in Th2 cells by Jun proteins J Immunol, 174 (2005), pp. 2098–2105

[43] Y. Yanagawa, K. Onoe Distinct regulation of CD40-mediated interleukin-6 and interleukin-12 productions via mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB-inducing kinase in mature dendritic cells Immunology, 117 (2006), pp. 526–535

[44] H.C. Liou, W.C. Sha, M.L. Scott, D. Baltimore Sequential induction of NF-kappa B/Rel family proteins during B-cell terminal differentiation Mol Cell Biol, 14 (1994), pp. 5349–5359

[45] S. Sacconi, S. Pantano, G. Natoli Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers Mol Cell, 11 (2003), pp. 1563–1574

[46] K. Koga, G. Takaesu, R. Yoshida, M. Nakaya, T. Kobayashi, I. Kinjyo, A. Yoshimura Cyclic Adenosine Monophosphate Suppresses the Transcription of Proinflammatory Cytokines via the Phosphorylated c-Fos Protein Immunity (2009)

Corresponding author : Abdelaziz Amrani

Address: Department of Pediatrics, Immunology Division, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, 3001 12th Avenue North, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 5N4. Fax: +1 819 564 5215.

¹These authors contributed equally to this work.

6 Chapitre 3. Implication de C/EBP β et de p38 dans les fonctions des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse en présence de GM-CSF

6.1 Role of C/EBP β and p38 in the regulation of the phenotype and IL-10/IL-12 gene expression in bone marrow-derived dendritic cells

Chantal Guindi, * Alexandre Cloutier, * Simon Gaudreau, * Claude Asselin,[†] Patrick P. McDonald, * Gilles Dupuis, * Abdelaziz Amrani*

* Immunology Division *, Faculty of Medicine and Health Sciences, and Centre de Recherche Clinique Etienne LeBel, University of Sherbrooke, 3001 12th Avenue North, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 5N4; [†] Department of anatomy and cell biology, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, 3001 12th Avenue North, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 5N4

Cet article est soumis à Journal of Immunology en avril 2013

6.1.1 Avant-propos

Dans cet article, j'ai effectué la majorité des expériences, j'ai planifié et coordonné la réalisation des expériences (tel que mentionné dans la section précédente). Finalement, j'ai aussi rédigé l'article.

6.1.2 Résumé

Les DCs jouent un rôle très important dans l'immunité innée et acquise ainsi que dans la tolérance au soi. Les fonctions tolérogéniques et immunologiques des DCs sont dictées par le niveau d'expression des molécules de costimulation et/ou par le profil de cytokines qu'elles produisent. Nous avons déjà démontré que les GM/DCs présentent un phénotype semi-mature et

produisent de l'IL-10 en concentration importante, ce qui leur confère des caractéristiques de DCs tolérogènes comparativement aux IL-4/DCs. Le facteur de transcription C/EBP β est impliqué dans la régulation de plusieurs gènes associés à l'inflammation. Cependant, très peu de choses sont connues au sujet de sa régulation chez les DCs. Dans cette étude, nous démontrons que les GM/DCs ont une forte liaison à l'ADN de C/EBP β comparativement aux IL-4/DCs suite à une stimulation au LPS. La phosphorylation ainsi que la liaison à l'ADN de CREB sont aussi supérieures chez les GM/DCs comparativement aux IL-4/DCs suite à une stimulation au LPS. Nous démontrons dans cette étude que p38 et la GSK3 jouent un rôle très important dans la liaison à l'ADN de CREB et de C/EBP β . L'inhibition de p38 chez les GM/DCs diminue fortement la liaison à l'ADN de C/EBP β et de CREB, diminue la production d'IL-10 et augmente la production d'IL-12p70. L'inhibition de la GSK3 chez les GM/DCs réduit la liaison à l'ADN de C/EBP β sans aucun effet sur la liaison à l'ADN de CREB ce qui résulte en une production accrue d'IL-10. L'inhibition de la GSK3, mais pas l'inhibition de p38, résulte en une augmentation de l'expression des molécules de costimulation. De plus, les expériences effectuées avec des GM/DCs de souris C/EBP β ^{-/-} ont démontré que C/EBP β est essentiel pour le maintien du phénotype semi-mature des DCs tolérogènes. Nos résultats montrent pour la première fois que C/EBP β et p38/ CREB sont impliqués dans le phénotype tolérogène des GM/DCs.

6.1.3 Abstract

Dendritic cells (DCs) play a major role in innate and adaptive immunity as well as self-immune tolerance. Immunogenic versus tolerogenic DC functions are dictated by their levels of costimulatory molecules and by their cytokine expression profile. We previously reported that bone marrow-derived DCs generated with GM-CSF (GM/DCs) have the signature of semi-mature tolerogenic IL-10-producing DCs as opposed to immunogenic IL-12 producing DCs generated with GM-CSF and IL-4 (IL-4/DCs). The transcription factor C/EBP β regulates the expression of several inflammatory genes in many cell types. However, little is known regarding the activation and functions of C/EBP β in DCs. In this study, we show that tolerogenic DCs (tDCs) exhibit enhanced C/EBP β DNA binding activity compared to immunogenic DCs after LPS stimulation. We found that p38 and GSK3 play important roles in regulating C/EBP β and CREB activities. We show that p38 inhibition in GM/DCs resulted in a drastic diminution of

C/EBP β and CREB DNA binding activities. Consequently, GM/DCs switched off their IL-10 production and increased IL-12p70 production, a characteristic of IL-4/DCs. We also demonstrate that GSK3 inhibition in GM/DCs reduced C/EBP β DNA binding activity and resulted in increased IL-10 production. Interestingly, GSK3 inhibition, but not p38 inhibition, increased the expression of costimulatory molecules in GM/DCs. Furthermore, analysis of GM/DCs from C/EBP $\beta^{-/-}$ mice showed that C/EBP β is essential to maintain the semimature phenotype and participates in early phases of IL-10 production. Our results demonstrate for the first time that p38 and C/EBP β are critical to establish DCs tolerogenic phenotype and functions.

6.1.4 Introduction

Dendritic cells (DCs) are potent antigen presenting cells (APCs) that play crucial roles in detecting microorganisms, in linking innate and adaptive immunity, and controlling immune tolerance to self (van Vliet *et al.*, 2007). DCs normally reside in tissues in an immature form (iDCs) but differentiate into semi-mature (smDCs) or fully mature (mDCs) DCs upon stimulation. Maturation signals come from either host-derived inflammatory molecules (CD40L, TNF α , IL-1, IL-6 and IFN α), or from microbial products and molecules that stimulate Toll-like receptors (Banchereau and Steinman, 1998). Depending on their state of maturation, DCs exhibit distinct APC functions (Steinman *et al.*, 2003). DCs can produce large amounts of inflammatory cytokines including TNF α , IL-1, IL-6 and IL-12, or anti-inflammatory cytokines such as IL-10 (McColl, 2002). Fully mature DCs drive polarization of T cells toward a Th1 phenotype by producing large amounts of IL-12, whereas smDCs inhibit Th1 responses and are involved in the differentiation of regulatory T cells (Tregs) by producing IL-10 (Besin *et al.*, 2008; Gaudreau *et al.*, 2007). We and others have reported that smDCs play a critical role in promoting and maintaining non-inflammatory immune T cell responses and produce high amounts of IL-10 but low amounts of IL-12 and (Besin *et al.*, 2008; Chorny *et al.*, 2005; Gaudreau *et al.*, 2010; Gaudreau *et al.*, 2007; Guindi *et al.*, 2012; Lutz and Schuler, 2002; Rutella *et al.*, 2004). Therefore, the state of maturation and the balance of inflammatory versus anti-inflammatory cytokines are crucial to determine the type of subsequent acquired immunity.

The mechanisms regulating gene expression associated with DCs maturation and function are not fully understood. The DC maturation program involves activation of the transcription factor NF- κ B (Burkly *et al.*, 1995; Ouaz *et al.*, 2002; Rescigno *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998) and one or several components of the MAP kinase pathways (Loscher *et al.*, 2005; Puig-Kroger *et al.*, 2001; Rescigno *et al.*, 1998). NF- κ B is a potent activator of genes encoding costimulatory molecules and pro-inflammatory cytokines during DC maturation (Huang *et al.*, 2001; Langenkamp *et al.*, 2000), whereas ERK activation has been associated with promotion of IL-10 production and inhibition of IL-12 production (Dillon *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2002). In connection with these findings, we reported that inhibition of the MEK1/2-AP-1 pathway reduced the production of IL-10 by approximately 50% and enhanced production of IL-12p70 without any effect on the

phenotype of smDCs (Guindi *et al.*, 2012). Similarly, Escors *et al.* reported that ERK is necessary but not sufficient for IL-10 production by smDCs (Escors *et al.*, 2008). Since the inhibition of the MEK1/2-AP-1 pathway did not affect the maturation of DCs but only their IL-10 production, these results suggest that other transcription factors play important roles in the regulation of genes associated with DCs maturation and function. One of these candidates is C/EBP β , a member of the C/EBP family of leucine zipper transcription factors known to participate in the regulation of many genes associated with inflammation (Poli, 1998). The C/EBP family consists of six isoforms (α , β , δ , ϵ , γ and ζ) that regulate differentiation of myeloid cells, hepatocytes and adipocytes, and are implicated in innate and adaptive immunity as well as in the inflammatory responses (Cassel and Nord, 2003; Centrella *et al.*, 2004; Friedman, 2007; Smink and Leutz, 2010). The importance of C/EBP β and C/EBP δ has been highlighted during inflammatory responses through the regulation of cytokine gene expression (Chang *et al.*, 2012; Huber *et al.*, 2012). Additionally, inflammatory mediators, such as TNF α and LPS, also regulate the activity and expression of C/EBP transcription factors (Poli *et al.*, 1998). In macrophages, C/EBP β has been shown to be involved in induction of many genes that play important roles in inflammation and immunity, including TNF α , IL-12p40, IL-6 and IL-1 (Poli *et al.*, 1998; Ramji and Foka 2002). Interestingly, LPS-stimulated macrophages from C/EBP β -deficient mice produced less IL-12, IL-6 and TNF α than wild-type mice and did not induce Th1 responses (Gorgoni *et al.*, 2002). In addition, cooperation of C/EBP β with other transcription factors such as the p50 subunit of NF- κ B, CREB/ATF, AP-1 and Sp1 could result in varied DNA binding affinities or specificities (Ramji and Foka, 2002). For example, interaction between Sp1 and C/EBP β induced by LPS stimulation cooperatively activated IL-10 gene expression in macrophages (Liu *et al.*, 2003). Another group reported that the IL-12p35 gene is a novel target for C/EBP β in macrophages which explains the persistence of IL-12p40 mRNA expression and the absence of IL-12p35 gene expression in C/EBP β -deficient macrophages (Gorgoni *et al.*, 2002). These results explain the defective expression of bioactive IL-12 and impaired Th1 response of C/EBP β -deficient mice, even in the presence of abundant IL-12p40 subunit (Gorgoni *et al.*, 2002).

There is considerable evidence that C/EBP β is regulated by other many proteins such as CREB, MAPK and GSK3 (Nerlov, 2008). CREB and C/EBP β have been shown to be essential for IL-10 gene expression and production in macrophages (Boyle *et al.*, 1991; Bradley *et al.*, 2003; Bullock

and Habener, 1998; Fiol *et al.*, 1994; Grimes and Jope, 2001a; Ruffell *et al.*, 2009). CREB activity is mainly regulated through its phosphorylation at serine 133, which can be mediated by kinases such as p38 (Park *et al.*, 2005) and GSK3, but phosphorylation of the serine 129 by GSK3 is also important in modulating CREB activity (Martin *et al.*, 2005). In this connection, it has been shown that C/EBP β phosphorylation by the GSK3 and by MAPK induces a conformational change that increases its transcriptional activation and DNA binding activity (Kim *et al.*, 2007). Interestingly, GSK3 inhibition augments CREB DNA binding, reduces IL-12 and increases IL-10 production in response to a variety of TLR agonists (Martin *et al.*, 2005). Despite the well-documented importance of C/EBP β in macrophages, the role of C/EBP β in tolerogenic DCs has not been investigated. In the present study, we demonstrated that C/EBP β and p38 are involved in regulating IL-10 and IL-12p70 production and the expression of costimulatory molecules in tolerogenic GM/DCs. Furthermore, this study defines the molecular pathways that regulate CREB and C/EBP β in tDCs.

6.1.5 Materials and Methods

Mice

C57BL/6, BALB/c and NOD mice were purchased from Taconic (Hudson, NY). C/EBP β -deficient mice were obtained from Dr Claude Asselin (Université de Sherbrooke) with the agreement of Dr Peter F Johnson (National Cancer Institute Frederick, MD). All mice were housed under pathogen-free conditions, in accordance with the guidelines of the Institutional Animal Care Committee of the University of Sherbrooke.

Preparation of BMDCs

GM/DCs were generated with GM-CSF (5 ng/ml). IL-4/DCs were generated using a combination of GM-CSF (5 ng/ml) and IL-4 (4.5 ng/ml) (Cedarlane, Burlington, ON) as described previously (Inaba *et al.*, 1993). In some set of experiments, IL-10/DCs were generated using a combination of GM-CSF (5 ng/ml), IL-4 (4.5 ng/ml) and IL-10 (10 ng/ml). At day 7, DCs were collected and left unstimulated or were exposed to LPS for 24 or 48 h (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 1 mg/ml).

Flow cytometry and antibodies

Anti-CD11c (clone HL3), anti-CD86 (clone GL1), and anti-CD80 (clone 16-10A1) were purchased from BD Biosciences (Mississauga, ON). The anti-CD40 antibody was purified from the supernatant of FGK 45.5 hybridoma cells. After cell staining, cell acquisitions were performed with a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using CellQuest ProTM software (BD Biosciences).

Kinases inhibition

BMDCs were pre-incubated with the p38 kinase inhibitor SB 203580 (10 μ M), or with GSK-3 inhibitors SB 216763 (10 μ M) or LiCl (10 mM), or with DMSO (vehicle) for 1 h before stimulation with LPS (1 μ g/ml).

Nuclear extract preparation

BMDCs were recovered by centrifugation and cell pellets were resuspended in cold lysis buffer (10 mM Tris Base, pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT containing protease and phosphatase inhibitors). After 10 min incubation on ice, an equal volume of the lysis buffer containing 0.2% NP-40 was added and the extracts were centrifuged at 1500 X g for 5 min at 4°C. The cytoplasmic fractions were recovered in the supernatants. The nuclear pellets were resuspended in lysis buffer containing 10% glycerol and NaCl was added to a final concentration of 400 mM. Following a 20-min incubation on ice, the samples were centrifuged at 13000 X g (15 min, 4°C) supernatants were collected and used as nuclear extracts.

EMSA and supershifts

EMSAs were conducted mainly as previously described (Cloutier *et al.*, 2009). Briefly, Nuclear extracts were added to 18μl total volume of binding buffer (20 mM Tris Base pH 7.5, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% NP40, 5% glycerol) containing 6 μg of acetylated BSA and 0.8 μg of poly dI-dC. Then, 10 fmoles of ³²P-end-labeled oligonucleotides were added to the binding reaction, which was further incubated for 15 min at room temperature. For supershift experiments, binding reactions were performed in the presence of specific antibodies, for 30 minutes at 4°C, before the addition of labeled oligonucleotides. Samples were electrophoresed on 5.5% native polyacrylamide gels in TBE 0.5X at 4°C. Dried gels were exposed to autoradiography film at -80°C. Oligonucleotides used were 5'-AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG-3' for the CREB DNA binding site and 5'-TGCAGATTGCGCAATCTGCA-3' for C/EBP. Antibodies used for supershifts were anti-C/EBPα (sc-61X), anti-C/EBPβ (sc-105X), anti-C/EBPδ (sc-151X), anti-C/EBPε (sc-158X) and anti-C/EBPγ (sc-7658X) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Western Blots

BMDCs were harvested, washed in cold PBS and resuspended in lysis buffer containing Tris Base 50 mM, NaCl 0.15 M, DTT 1 mM, Triton X-100 1% (v/v) and a cocktail of protease and phosphatase inhibitors. Cell lysates were fractionated on 10% SDS-PAGE gels, transferred to

nitrocellulose membrane (Hybond-ECL Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC) and incubated overnight with primary antibodies against pC/EBP β (Thr188), C/EBP β , pCREB (Ser133), CREB, β -actin (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA), or pCREB (Ser129) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Thereafter, blots were incubated with appropriate secondary antibodies and revealed by enhanced chemiluminescence (GE Health Care, Baie d'Urfé, QC).

Measurements of cytokine production

BMDCs were plated in 96-well culture plates at a density of 1×10^6 cells/ml in the absence or presence of LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24 or 48h. IL-10, IL-12p70 and IL-6 secretion was quantified in the supernatants by ELISA kits, according to manufacturer's instructions (R&D Systems).

Real-time PCR analysis

For each experimental condition, total RNA was extracted from 5×10^6 BMDCs using Trizol (Invitrogen, Burlington, ON., Canada), $1 \mu\text{g}$ of the resulting ARN was then reverse transcribed with Superscript II (Invitrogen) and OligodT (Promega). Duplicate real-time PCR reactions for each sample were performed in a volume of $25 \mu\text{l}$ containing 10 ng of cDNA and $1 \mu\text{M}$ of each forward and reverse primers (Table 1), using a Quantitect SYBR Green qPCR kit (Qiagen) in a Rotorgene 3000 instrument (Corbett Research, Sydney, Australia). Reaction conditions were as follows: 95°C for 5 min, followed by 35 cycles (94°C for 30s, 60°C for 45s, 72°C for 60s in the case of IL-12p35 and IL-12p40, or 94°C for 30s, 64°C for 45s, 72°C for 60s for IL-10 and TGF- β). Amplification plots were generated using the Rotorgene Amplification software v6.0 (Corbett Research) and fold increases were calculated by the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method and normalized with β -actin expression.

Gene	Forward Primers	Reverse Primers	Tm
IL-12p35	CTC CTA AAC CAC CTC AGT TTG GCC AGG GTC	TAG ATG CTA CAA GGC ACA GGG TCA TCA TC	60
IL-12p40	CAC TCA TGG CCA TGT GGG AGC TGG AGA AAG	TCC GGA GTA ATT TGG TGC CTT CAC ACC TCA G	60
IL-10	TAC CTG GTA GAA GTG ATG CC	CAT CAT GTA TGC TTC TAT GC	64
β -actin	ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA	TCA TGG ATG CCA CAG GAT TC	55 - 6

Table 1. Sequence of primers used for real-time PCR

6.1.6 Results

C/EBP β DNA binding activity in GM/DCs and in IL-4/DCs

We have recently reported that LPS-stimulated GM/DCs from NOD mice exhibit a semi-mature phenotype, as they produce high amounts of IL-10 and low IL-12 (Guindi *et al.*, 2012). In addition, we found that the ERK1/2 MAP kinase is important but not sufficient to regulate the IL-10/IL-12p70 balance and that this MAP kinase is not involved in regulating DC maturation. In macrophages, the transcription factor C/EBP β has been shown to be a critical regulator of the expression of IL-10 and IL-12p35 (Csoka *et al.*, 2007; Gorgoni *et al.*, 2002). Whether C/EBP β regulates the maturation status and/or the production of IL-10 and IL-12p70 in DCs has not been investigated. In a first set of experiments, we examined C/EBP DNA binding activity in nuclear extracts prepared from GM/DCs and IL-4/DCs of NOD and BALB/c mice by EMSA. In unstimulated GM/DCs and IL-4/DCs of both strains of mice, a very weak C/EBP DNA binding activity was detected in nuclear extracts (Fig. 1A). However, following 48h of stimulation with LPS, a strong induction of C/EBP DNA binding activity was detected in GM/DCs compared to a very weak binding activity in IL-4/DCs from both strains of mice (Fig. 1A). Similar data were obtained in bone marrow DCs were derived from C57BL/6 mice (Fig. 1B). Because GM/DCs of NOD mice displayed tolerogenic properties such as reduced capacity to activate CD8⁺ T cells and high efficiency to induce and expand Tregs (Guindi *et al.*, 2012), we investigated whether strong C/EBP DNA binding activity is associated with tolerogenic potential of DCs. To this end, C/EBP DNA binding activity was analyzed in tolerogenic IL-10/DCs of NOD and C57BL/6 mice generated in the presence of GM-CSF, IL-4 and IL-10 (Sato *et al.*, 2002; Steinbrink *et al.*, 2002; Steinbrink *et al.*, 1997; Wakkach *et al.*, 2003). Interestingly, we also found a strong C/EBP DNA binding activity in LPS-stimulated tolerogenic IL-10/DCs in both strains of mice (Fig. 1B). Thus C/EBP binding activity levels in GM/DCs of NOD mice are congruent with ours findings in BALB/c or C57BL/6 mice, suggesting that these results hold true in these three strains of mice. To determine which members of the C/EBP family bind DNA in the nuclear extracts of LPS-stimulated GM/DCs, supershift analyses were conducted. As shown in Fig 1C, only the C/EBP β isoform binds the C/EBP probe in GM/DCs nuclear extracts from both NOD and BALB/c mice. Based on this observation, further experiments were performed in NOD mice. Since the first set of experiments were performed before or after 48 h of LPS stimulation, a time course study was

performed to evaluate the C/EBP β DNA binding activity in GM/DCs and IL-4/DCs and to determine if the DNA binding activity was transient in IL-4/DCs (Fig.1D). Our results showed that C/EBP β DNA binding in nuclear extracts from LPS-stimulated GM/DCs was increased at 1 h after stimulation, peaked at 8h, and progressively decreased with time but remained always higher as compared to IL-4/DCs (Fig. 1D). In IL-4/DCs, no DNA binding activity was observed at all times analyzed in these experiments. Since C/EBP β phosphorylation on Thr188 primes its subsequent phosphorylation by GSK3, which facilitates and increases its DNA binding capacity (Kim *et al.*, 2007; Piwien-Pilipuk *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2005), we sought to determine the levels of C/EBP proteins phosphorylated on Thr188 in the lysates from GM/DCs and IL-4/DCs. Western blot with phospho-specific antibodies showed that LPS stimulation resulted in increased levels of phosphorylated C/EBP β (LAP) on Thr188 in GM/DCs as compared to lower levels of phosphorylated C/EBP β in IL-4/DCs (Fig. 1E).

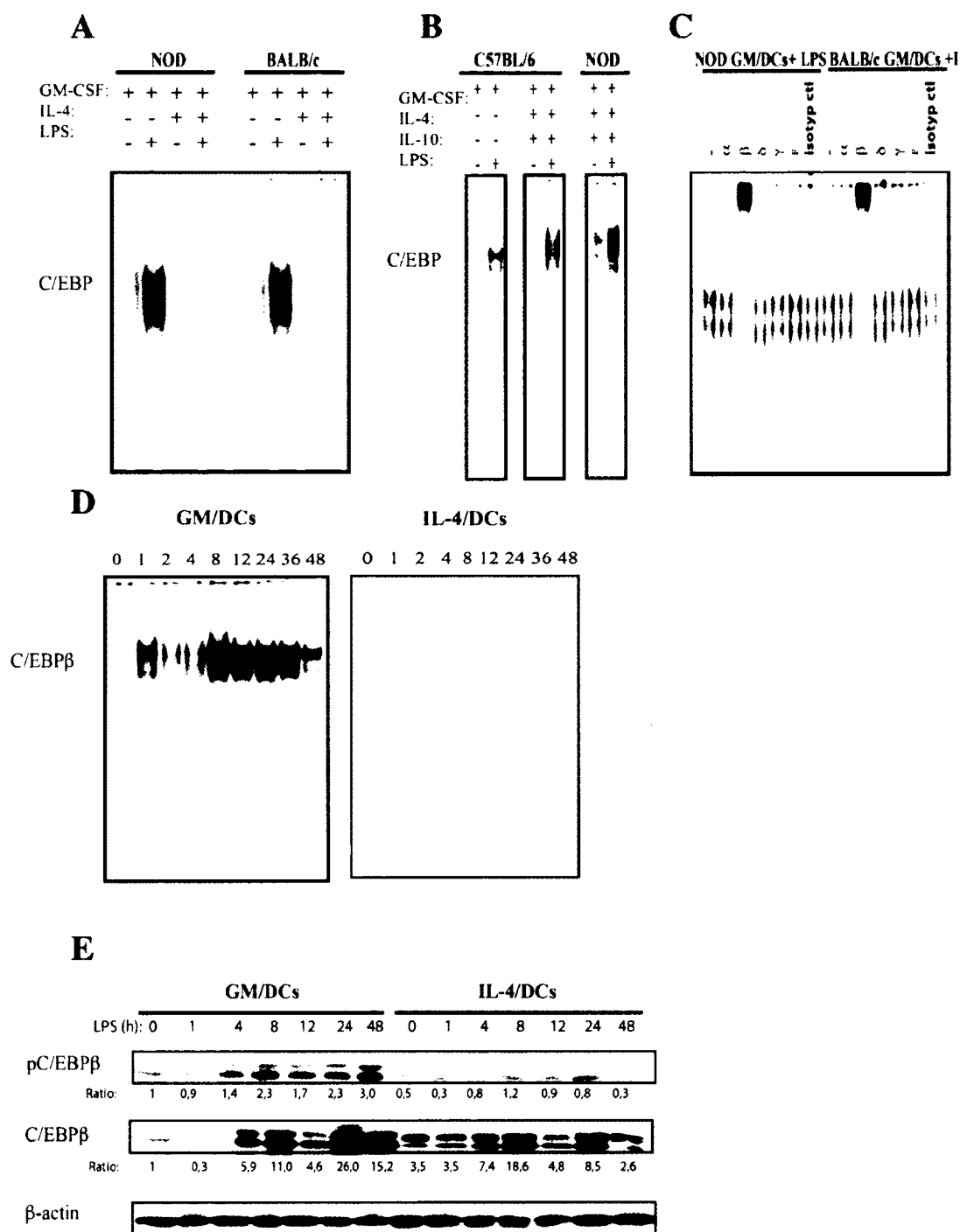
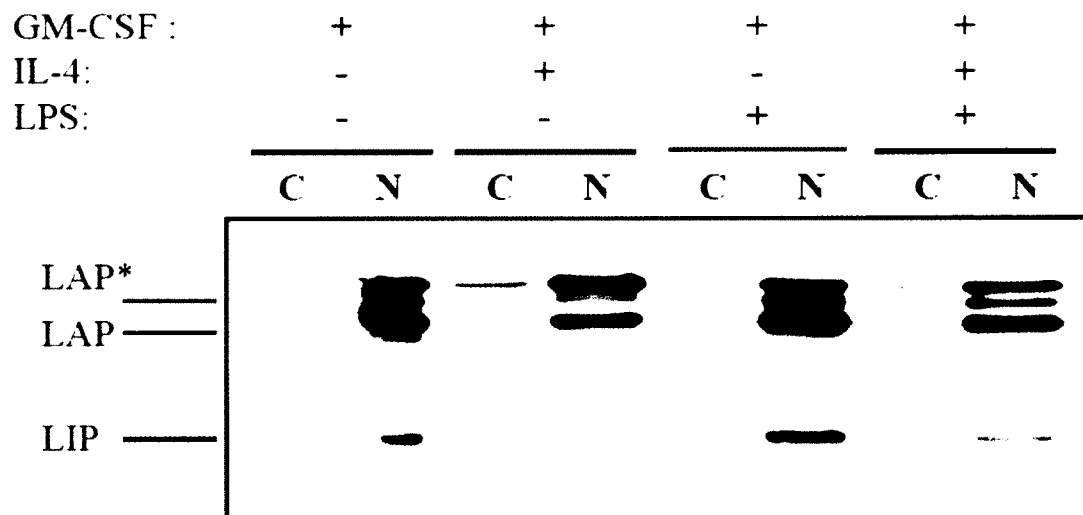


Figure 1. C/EBP β DNA binding activity is induced in LPS-stimulated GM/DCs.

A) Bone marrow-derived GM/DCs and IL-4/DCs were generated from NOD and BALB/c mice. Nuclear extracts were prepared before or after LPS stimulation (1 μ g/ml for 48h) and subjected to EMSA to assess C/EBP binding activity. B) Bone marrow-derived GM/DCs and IL-10/DCs

(GM-CSF+IL-4+IL-10) from C57BL/6 and NOD mice were generated. Nuclear proteins were extracted before or after LPS stimulation (1 μ g/ml for 48 h) and C/EBP binding activity was determined by EMSA. C) Supershift analyses were performed with nuclear extracts from LPS stimulated GM/DCs of NOD and BALB/c mice as described in material and methods. D) C/EBP β DNA binding activity was monitored by EMSA, with nuclear extracts from LPS-stimulated GM/DCs and IL-4/DCs from NOD mice at indicated times. E) pC/EBP β (Thr188) and C/EBP β levels in cell lysates from LPS stimulated GM/DCs and IL-4 DCs were analyzed by Western blot. Densitometric analysis was performed to determine the ratio of the intensity of the pC/EBP β band and C/EBP β relative to beta-actin band. Ratio are expressed as fold increases over unstimulated GM/DCs. Data are representative of at least 3 independent experiments. β -actin was used as a loading control.

Moreover, expression of nuclear C/EBP β protein was higher in GM/DCs than in IL-4/DCs (Supplementary Fig. 1 and Fig. 1E). Together, these results showed an increased C/EBP β phosphorylation that correlates with enhanced DNA binding activity in LPS-stimulated tolerogenic GM/DCs as opposed to immunogenic LPS-stimulated IL-4/DCs.



Supplementary Figure 1. Cellular localization of C/EBP β in GM/DCs and IL-4/DCs.

Bone marrow-derived GM/DCs and IL-4/DCs were stimulated with or without LPS (1 μ g/ml) for 48 h. C/EBP β protein levels in nuclear (N) and cytosolic (C) extracts were determined by western blotting as described in material and methods. The position of the three C/EBP β isoforms LAP*, LAP and LIP is indicated.

Effect of p38 MAPK and GSK3 inhibitors on C/EBP β and CREB phosphorylation and DNA binding activities in GM/DCs

It has been previously reported that C/EBP β phosphorylation by MAPK and subsequently by GSK3 β leads to increased DNA binding (Tang *et al.*, 2005). To determine the contribution of each kinase on C/EBP β DNA binding activity, we treated GM/DCs with the p38 MAPK inhibitor SB203580, or with GSK3 inhibitor SB216763 prior stimulation with LPS. Both inhibitors reduced C/EBP β DNA binding activity as assessed by EMSA (Fig. 2A). The downstream targets of the p38 MAPK include a wide array of cytoplasmic and nuclear factors including CREB, which is known to induce C/EBP β transcription following its phosphorylation on serine residues (Bradley *et al.*, 2003; Ruffell *et al.*, 2009). Western Blot analysis clearly showed a rapid and intense CREB phosphorylation at Ser133 and Ser129 in GM/DCs, as compared to low pCREB levels in IL-4/DCs (Fig. 2B). Next, we investigated whether p38 MAPK inhibitor SB203580 also affects CREB phosphorylation and its DNA binding activity in GM/DCs. We found that CREB DNA binding activity observed in LPS stimulated GM/DCs was drastically reduced in the presence of p38 MAPK inhibitor SB203580 whereas no effect was observed with the GSK3 inhibitor SB216763 (Fig. 2C). However, a significant decrease was observed in the levels of phosphorylated CREB on Ser129, which indicates a potential increase in CREB transcriptional activity (Supplemental Fig. 2) (Larabee *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2005). Consistent with this observation, decreases in both total and Thr188 phosphorylated forms of C/EBP β were observed in the presence of p38 MAPK inhibitor SB203580, whereas addition of GSK-3 β inhibitor SB216763 led to a slight diminution of C/EBP β phosphorylation and total C/EBP β protein (Fig. 2D). These data indicate that the p38 MAPK and GSK-3 β play a critical role in inducing C/EBP β DNA binding activity in tolerogenic semimature GM/DCs.

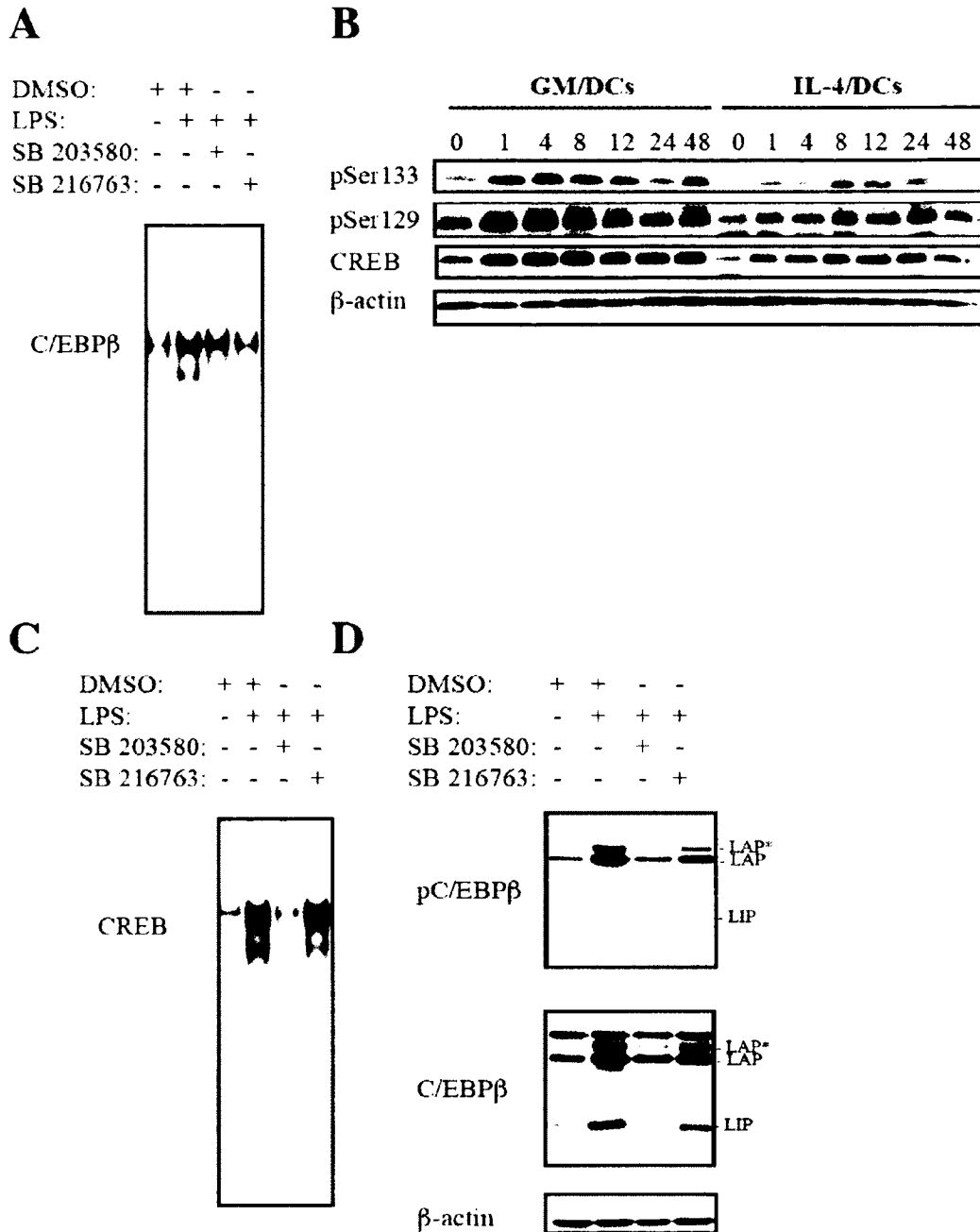
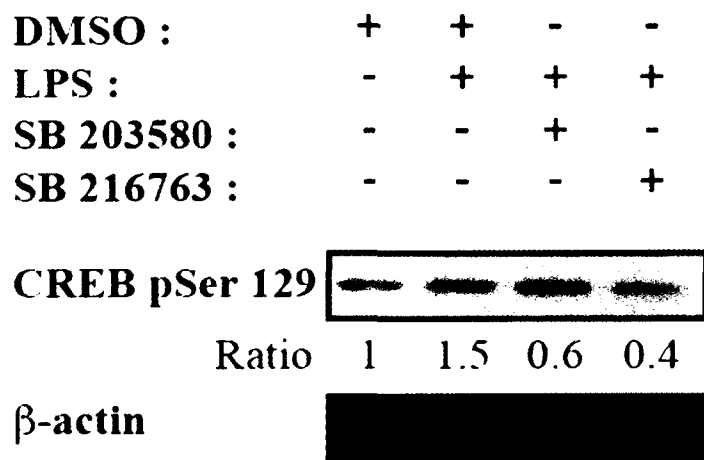


Figure 2. Signaling pathways involved in the activation of C/EBPβ and CREB in GM/DCs.

Bone marrow-derived GM/DCs were preincubated with kinase inhibitors SB203580 (10 μ M), SB 216763 (10 μ M) or vehicle (DMSO) for 1 h before stimulation with LPS (1 μ g/ml) for 8 h. A) C/EBPβ DNA binding activity in nuclear extracts were analyzed by EMSA. B) The levels of phosphorylated Ser129 and Ser133 , as well as, total CREB were analyzed by Western blot in

whole cell lysates at indicated times (hours) after LPS stimulation. β -actin was used as a loading control. C) CREB DNA binding activity in nuclear extracts was analyzed by EMSA. D) Levels of phosphorylated Thr188 and total C/EBP β were analyzed by Western blot in whole cell lysates after 8 h of LPS stimulation. The position of the three C/EBP β isoforms LAP*, LAP and LIP is indicated. β -actin was used as a loading control. Data are representative of 2 independent experiments.



Supplementary Figure 2. Effect of p38 and GSK-3 inhibitors on CREB activity in LPS-stimulated GM/DCs.

Bone marrow-derived GM/DCs were preincubated for 1h with 10 μ M SB203580, 10 μ M SB216763, or the vehicle (DMSO) before stimulation with LPS (1 μ g/ml) for 8 h. Phosphorylation at Ser129 and total CREB were analyzed in whole cell lysates by Western blotting. Densitometric analysis was used to determine the ratio of the intensity of the pCREB Ser129 band relative to beta-actin band. Ratio are expressed as fold increases over unstimulated GM/DCs.

Functional impact of inhibition of C/EBP β DNA binding and p38 on cytokine production and phenotype of GM/DCs

Because C/EBP β is involved in the production of IL-10 (Csoka *et al.*, 2007) and IL-12p70 (Gorgoni *et al.*, 2002) in macrophages, we examined whether inhibition of C/EBP β DNA binding activity in LPS-stimulated GM/DCs affects IL-10 and IL-12p40 and IL-12p35 gene expression and protein production. In agreement with our previous report (Guindi *et al.*, 2012), LPS induced a significant increase in the mRNA expression and secretion of IL-10, whereas it only promoted a modest induction of IL-12p70 expression and secretion (Fig. 3). Interestingly, pretreatment with a p38 inhibitor (SB203580) reduced significantly IL-10 gene expression and secretion (Fig. 3A and 3D) whereas it enhanced significantly IL-12p35 gene expression and IL-12p70 secretion (Fig. 3B and 3E). In contrast, a pretreatment with a GSK3 inhibitor (SB216763) enhanced significantly IL-10 mRNA expression and protein secretion (Fig. 3A and 3D). SB216763 also enhanced IL-12p35 mRNA expression, although to a lesser extent than the p38 inhibitor (Fig. 3B). Furthermore, pretreatment with SB216763 reduces significantly IL-12p70 production suggesting that SB216363 downregulates IL-12p70 production through inhibition of IL-12p35 translation (Fig. 3E). No significant changes was observed in IL-12p40 mRNA expression in the presence of SB203580 or SB216763 inhibitors (Fig. 3C).

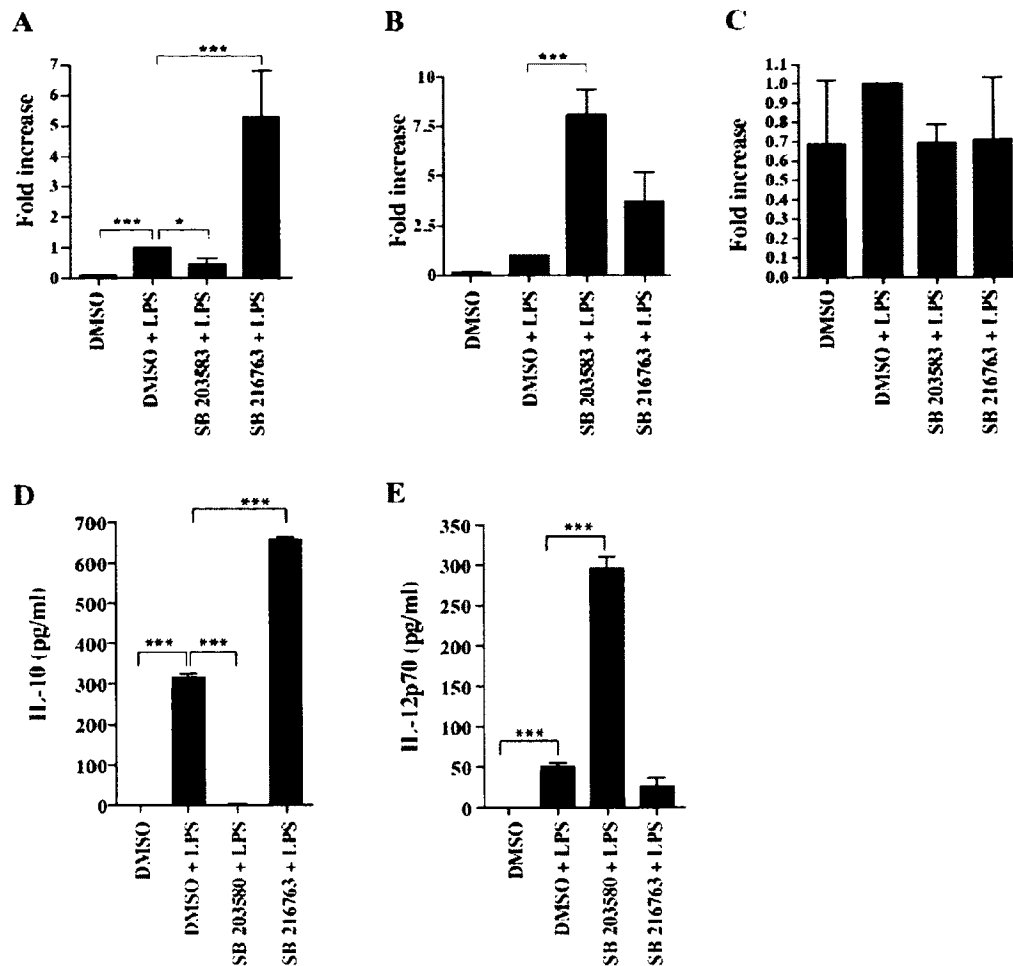
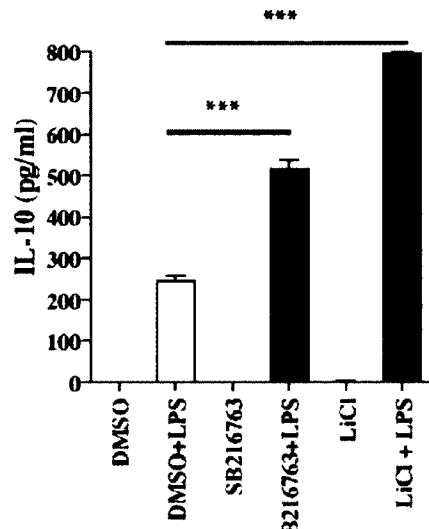
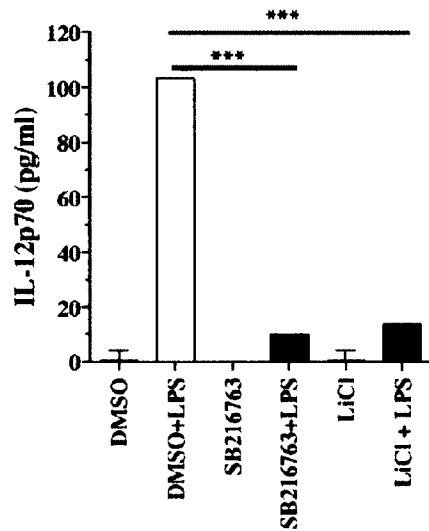


Figure 3. Inhibition of p38 or GSK3 activity regulates anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines.

Bone marrow-derived GM/DCs were preincubated for 1h with 10 μ M SB203580, 10 μ M SB216763, or vehicle (DMSO) before stimulation with LPS (1 μ g/ml) for 12h. Total RNA was isolated and the expression of IL-10 (A), IL-12p35 (B) and IL-12p40 (C) was determined by real-time PCR. Fold increases are calculated over the DMSO + LPS condition. Data are representative of 5-6 independent experiments. GM/DCs were preincubated for 1h with 10 μ M SB203580, 10 μ M SB216763, or vehicle (DMSO) before stimulation with LPS (1 μ g/ml) for 24h. The production of IL-10 (D) and IL-12p70 (E) was analyzed in cell supernatants by ELISA. Data are representative of 3 independent experiments. Results are shown as the mean \pm SEM. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Treatment with LiCl, another GSK3 inhibitor, resulted in a similar switch in IL-10 and IL-12p70 secretion profiles, as observed with SB216763 inhibitor (Supplementary Fig. 3). Taken together, these results suggest that p38 and GSK3 kinases are involved in the regulation of CREB and C/EBP β DNA binding activity, which appear to be important in fine-tuning the balance of IL-10/IL-12p70 production in GM/DCs.

A**B****Supplementary Figure 3. Effects of GSK3 inhibition on cytokine production in GM/DCs.**

Bone marrow-derived GM/DCs were preincubated for 1 h with DMSO, LiCl (10 mM), or SB216763 (10 μ M) before stimulation with LPS (1 μ g/ml) for 24h. ELISA was performed to measure the production of IL-10 (A) and IL-12p70 (B) in cell supernatants. Data are representative of 3 independent experiments. Results are shown as the mean \pm SEM (***) p < 0.001).

To determine whether the reduced production of IL-10 and the enhanced IL-12p70 production by GM/DCs incubated in the presence of p38 MAPK and GSK3 inhibitors correlates with enhanced maturation of GM/DCs, we analyzed the expression of the costimulatory molecules, CD80, CD86, and CD40, upon LPS stimulation. FACS analysis showed that p38 MAPK inhibitor SB203580 enhanced CD86 expression, but not that of CD80 and CD40 (Fig. 4A) whereas GSK3 inhibitor LiCl enhanced the expression of CD80 and CD86 but not that of CD40 (Fig. 4B). The mature phenotype acquired in the presence of these inhibitors, in particular the GSK3 inhibitor, was similar to that of mature IL-4/DCs generated in the presence of GM-CSF and IL-4 (Fig. 4C). Together, these data suggest that the inhibition of C/EBP β DNA binding might induce a switch from the semimature IL-10 producing GM/DCs to fully mature IL-12p70 producing DCs.

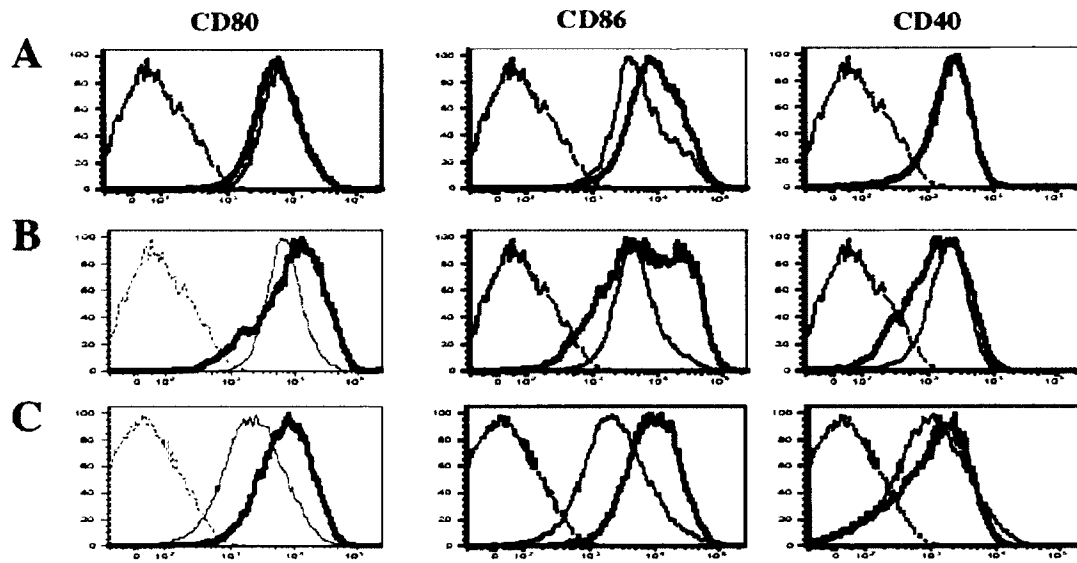


Figure 4. Inhibition of GSK3 but not p38 enhances GM/DCs maturation status.

Bone marrow-derived GM/DCs were preincubated with vehicle (DMSO, solid thin line) or 10 μ M SB203580 (**A**) (solid bold line) or 10 mM LiCl (**B**) (solid bold line) before stimulation with LPS (1 μ g/ml) for 48 h. Cells were harvested and the expression of CD80, CD86 and CD40 molecules was analyzed by gating on CD11c⁺ cells using flow cytometry. **C**) Bone marrow-derived IL-4/DCs were left unstimulated (solid thin line) or were stimulated with LPS (1 μ g/ml) for 48 hours (solid bold line). For all panels, isotype control stainings are shown (dashed thin line) Data are representative of 2-4 independent experiments.

Effect of C/EBP β deficiency on the phenotype of GM/DCs

To evaluate the role of C/EBP β in regulating DCs maturation status, GM/DCs were derived from bone marrow of C/EBP $\beta^{+/+}$ and C/EBP $\beta^{-/-}$ mice and were stimulated with or without LPS. FACS analysis showed that unstimulated GM/DCs and IL-4/DCs from wild-type and knockout mice express low levels of CD80, CD86 and CD40 (Fig. 5A). In agreement with our previous report (Guindi *et al.*, 2012), LPS-stimulated GM/DCs from C/EBP $\beta^{+/+}$ mice displayed a semimature phenotype whereas IL-4/DCs displayed a fully mature phenotype (Fig. 5B). Interestingly, LPS-stimulated GM/DCs derived from C/EBP $\beta^{-/-}$ mice displayed a fully mature phenotype, as indicated by enhanced expression of CD80 and CD86 compared to GM/DCs from C/EBP $\beta^{+/+}$ mice (Fig. 5B). In addition, levels of CD80 and CD86 in GM/DCs from C/EBP $\beta^{-/-}$ mice were similar to those expressed by LPS-stimulated IL-4/DCs derived from C/EBP $\beta^{+/+}$ mice (Fig. 5B). These data suggest that C/EBP β plays an important role in limiting GM/DC maturation.

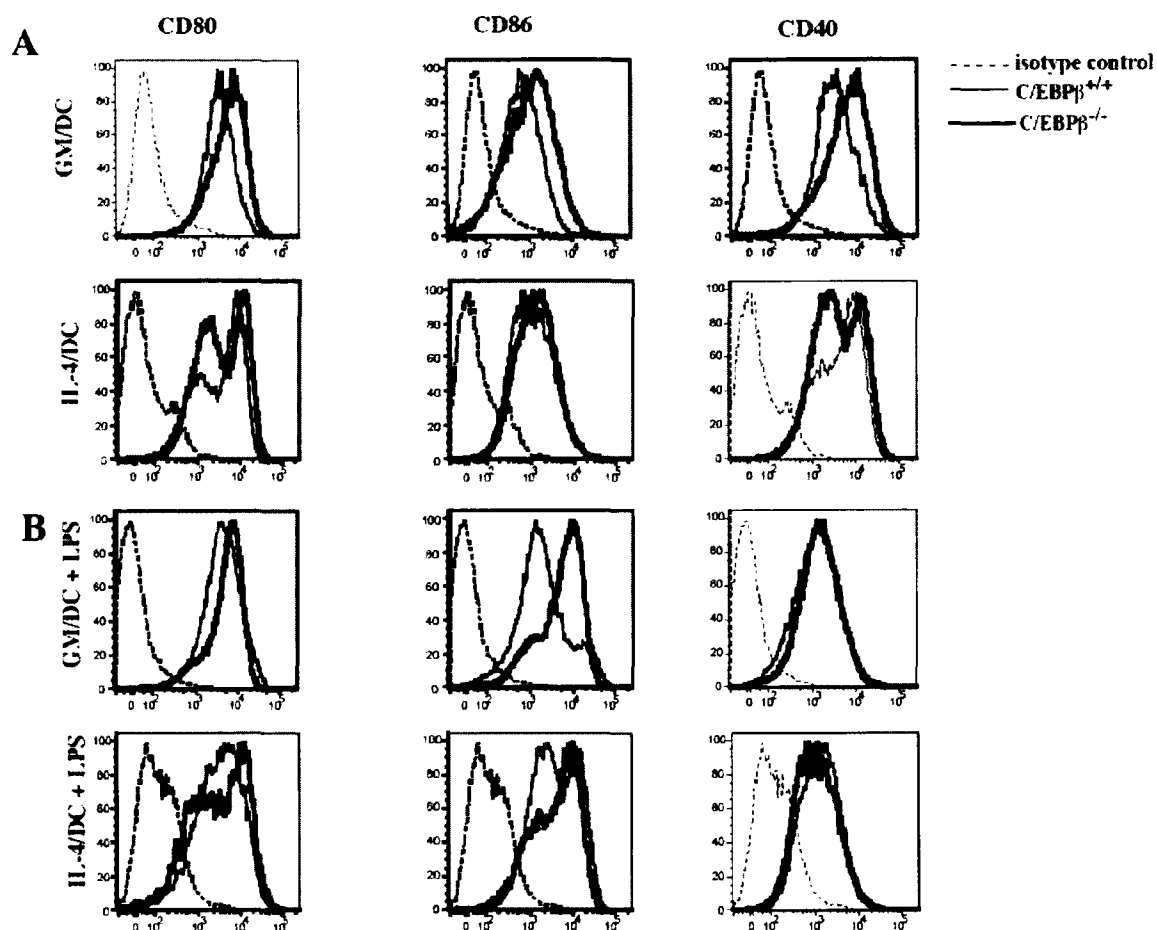


Figure 5. Effect of C/EBP β deficiency on the maturation status of GM/DCs.

Bone marrow-derived GM/DCs and IL-4/DCs were generated from C/EBP $\beta^{+/+}$ mice (thin solid line) and C/EBP $\beta^{-/-}$ mice (bold solid line). DCs were left unstimulated (**A**) or exposed to LPS (48 h, 1 μ g/ml) (**B**) and were stained and analyzed to assess CD80, CD86 and CD40 expression on CD11c $^{+}$ cells using FACS. Dashed thin lines represent labeling with isotype control antibodies. The results are representative of 3 independent experiments.

Effect of C/EBP β deficiency on cytokine gene expression and release by GM/DCs.

Next, we sought to determine the consequence of C/EBP β deficiency on IL-10 and IL-12 mRNA and protein expression in GM/DCs. As shown in Fig. 6, LPS-stimulated GM/DCs from C/EBP $\beta^{+/+}$ mice express more IL-10 mRNA transcripts than IL-12p35 mRNA transcripts. The expression levels of both transcripts were dramatically reduced in LPS-stimulated GM/DCs derived from C/EBP $\beta^{-/-}$ mice (Fig. 6A and B). IL-12p40 mRNA levels were transiently increased in GM/DCs from C/EBP $\beta^{-/-}$ mice (Fig. 6C). In agreement with impaired IL-6 expression in C/EBP β -deficient macrophages (Gorgoni *et al.*, 2002), we also found a profound decrease in IL-6 mRNA in GM/DCs from C/EBP $\beta^{-/-}$ mice as compared to GM/DCs from C/EBP $\beta^{+/+}$ mice (Fig. 6D).

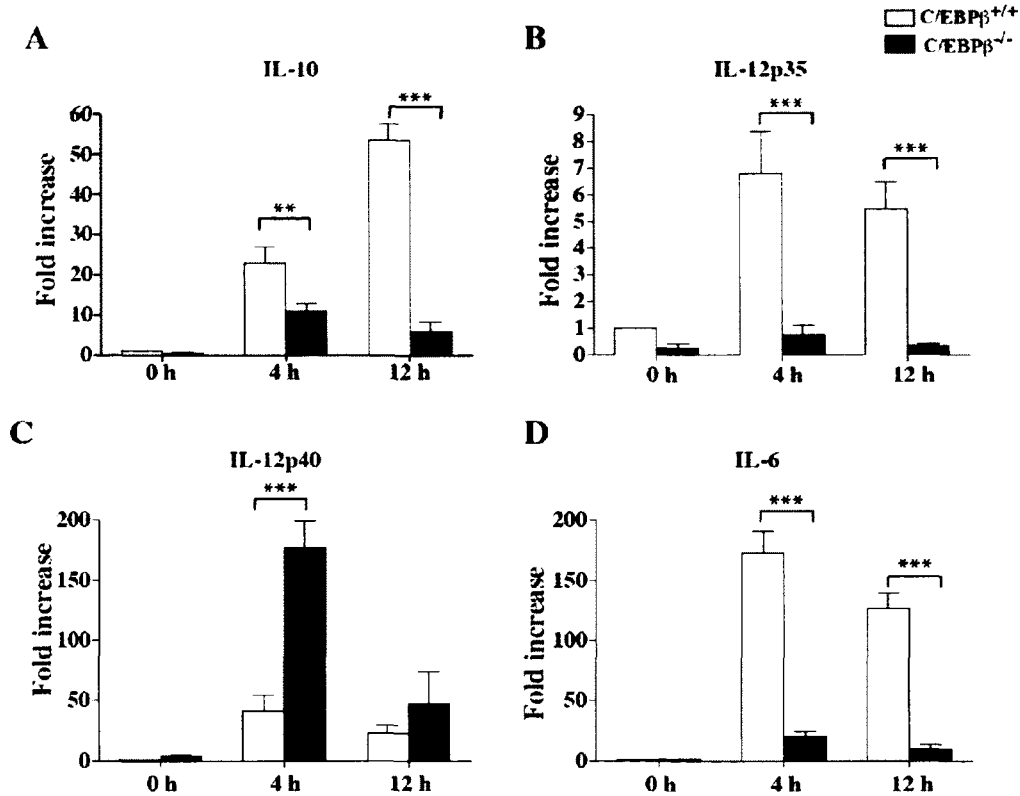


Figure 6. Effect of C/EBPβ deficiency on IL-10 and IL-12 gene expression by GM/DCs.

Bone marrow-derived GM/DCs generated from C/EBPβ^{-/-} or C/EBPβ^{+/+} mice were left unstimulated or were stimulated with LPS (1 μg/ml) for 4 h and 12 h. The expression of IL-10 (A), IL12p35 (B), IL-12p40 (C) and IL-6 (D) was determined by real-time PCR. Data are presented as fold increases over unstimulated GM/DCs from C/EBPβ^{+/+} (t = 0). Data are representative of 4 independent experiments. Results are shown as the mean ± SEM (** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001).

Analysis of the secreted cytokines showed that GM/DCs from C/EBP β ^{-/-} mice produce lower amounts of IL-10 after 24 h of LPS stimulation. After 48 h of LPS stimulation, IL-10 secretion from GM/DCs of both C/EBP β ^{-/-} and C/EBP β ^{+/+} mice was similar (Fig. 7A). In addition, GM/DCs from C/EBP β ^{-/-} mice produced significantly less IL-12p70 compared to GM/DCs from C/EBP β ^{+/+} mice (Fig. 7B). Similarly, IL-6 production by GM/DCs of C/EBP β ^{-/-} mice was drastically reduced compared to GM/DCs of C/EBP β ^{+/+} mice (Fig. 7C). These data indicate that C/EBP β is an important transcription factor that contributes to cytokine gene expression, at least in the early stage of IL-10 gene regulation, in LPS-stimulated semimature GM/DCs.

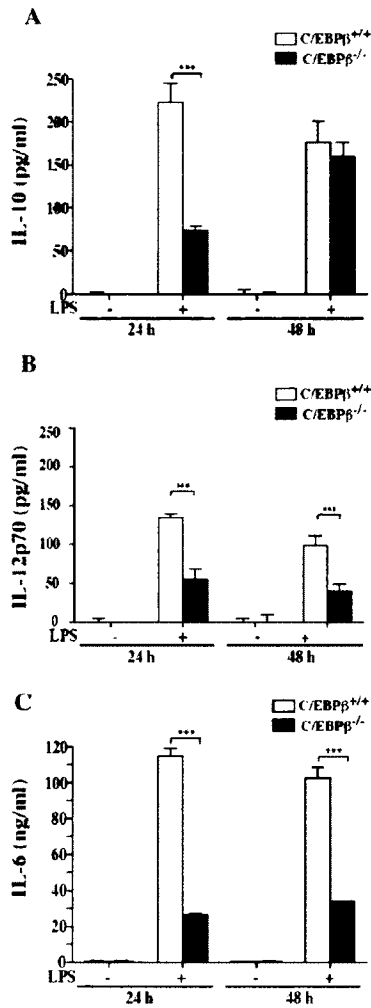


Figure 7. Effect of C/EBPβ deficiency on cytokine secretion by GM/DCs.

Bone marrow-derived GM/DCs were generated from C/EBPβ^{-/-} or C/EBPβ^{+/+} mice and were stimulated for 24 or 48 h with LPS (1 μg/ml) or were left unstimulated. Cell supernatants were collected and IL-10 (A), IL-12p70 (B) and IL-6 (C) productions were analyzed by ELISA. Data are representative of 3 independent experiments. Results are shown as the mean ± SEM (***) $p < 0.001$).

6.1.7 Discussion

Previously, we reported that *in vitro* bone marrow-derived GM/DCs exhibit a signature of tolerogenic semimature DCs whereas IL-4/DCs exhibit the functional properties and phenotype of fully mature immunogenic DCs (Guindi *et al.*, 2012). The present findings represent the first demonstration of the function of C/EBP β in regulating the phenotype and cytokine production of tolerogenic DCs.

It is well established that the maturation stage and the nature of cytokines produced by DCs are important determinants of their tolerogenic versus their immunogenic functions. Fully mature DCs potently induce effector T cell responses via increased expression levels of costimulatory molecules such as CD80 and CD86 and pro-inflammatory cytokines such as IL-12 and IL-6. In contrast, low or intermediate expression levels of maturation markers, as well as IL-10 secretion, are characteristic of tolerogenic DCs. Indeed, inhibition of DC maturation and reduction in the production of pro-inflammatory cytokines are important events in the induction and maintenance of immune tolerance. Of interest, dendritic cells play a critical role in the initiation and progression of autoimmune diseases including type 1 diabetes (Jansen *et al.*, 1994). We and others have shown that BMDCs generated from NOD mice display a more mature phenotype, produce more proinflammatory cytokines (such IL-12p70) but less anti-inflammatory cytokines (such IL-10), and promote pro-inflammatory Th1 responses (Guindi *et al.*, 2012; Poligone *et al.*, 2002; Feili-Hariri *et al.*, 2001). We also reported that splenic DCs from GM-CSF treated NOD mice and bone marrow-derived GM/DCs exhibit properties of semi-mature tolerogenic DCs (Gaudreau *et al.*, 2010; Guindi *et al.*, 2012). In the current study, we show that C/EBP β is activated in tolerogenic DCs (GM/DCs) upon LPS stimulation but not in immunogenic DCs (IL-4/DCs). Thus, our findings highlight its crucial importance in the regulation of the tolerogenic DCs functions.

It is well documented that C/EBP β requires the phosphorylation of two residues for its optimal transcriptional activity (Kim *et al.*, 2007; Piwien-Pilipuk *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2005). Its phosphorylation on-Thr188 is mediated by p38 MAPK or by ERK1/2, depending on the cell type (Tang *et al.*, 2005) We found herein that p38 MAPK is involved in the phosphorylation of this

residue in GM/DCs, which also entails an altered DNA binding activity. The drastic reductions in C/EBP β phosphorylation and its DNA binding activity correlated with a decrease in CREB DNA binding activity, which is known to regulate C/EBP β expression (Niehof *et al.*, 1997). The other phosphorylation of C/EBP β is mediated by GSK3 at residues Thr179 and Ser184, and allows the protein to achieve a conformation needed to bind DNA (Kim *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2005). GSK3 is known to phosphorylate several other transcription factors such as CREB and AP-1, which regulate IL-10 gene expression (Beurel and Jope, 2008; Gotschel *et al.*, 2008). In agreement with these observations, we observed a strong phosphorylation of CREB at Ser129 and Ser 133 in GM/DCs but not in IL-4/DCs, indicating a strong GSK3 activity in tolerogenic GM/DCs. In IL-4/DCs, CREB phosphorylation at Ser129 was less important, which correlated with a reduced GSK3 activity. It is possible that the reduced phosphorylation of CREB on this residue in IL-4/DCs reflects the fact that IL-4 is an important activator of the PI3K/Akt pathway (Harris *et al.*, 2007), which phosphorylates and inactivates the GSK3 (Cross *et al.*, 1995).

We have previously demonstrated that MEK1/2 inhibition in GM/DCs resulted in the inhibition of AP-1 DNA binding activity and the loss of IL-10 production (Guindi *et al.*, 2012). We further investigated if other molecules were implicated in IL-10 production. Here, we show that the GSK3 inhibition in GM/DCs increased IL-10 mRNA expression and secretion. Furthermore, when GSK3 was inhibited, we also found an increased expression of costimulatory molecules. Other studies have also demonstrated that GSK3 inhibition in monocyte-derived DCs resulted in an increased expression of costimulatory molecules (Rodionova *et al.*, 2007). Another transcription factor implicated in the expression of costimulatory molecules is CREB. Adreshna *et al.* have previously reported that CREB is essential for the expression of CD80, CD83 and CD86 in human monocyte derived DCs (Ardeschna *et al.*, 2000). Since GM/DCs are resistant to maturation, we investigated which molecular pathway could explain this particular feature. In this perspective, we found that p38 inhibition resulted in a drastic reduction of CREB and C/EBP β DNA binding activities. However, no augmentation of costimulatory molecule levels was observed when p38 was inhibited in LPS-stimulated GM/DCs. This could be attributed to the lack of CREB DNA binding activity, as previously reported (Ardeschna *et al.*, 2000). We observed that GSK3 inhibition led to reduced C/EBP DNA binding activity without affecting CREB DNA binding, but CREB Ser129 phosphorylation was decreased, which correlates with an

increase of CREB transcriptional activity. (Larabee *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2005). This was accompanied by an increased expression of costimulatory molecules on GM/DCs. This observation is corroborated by the increased expression of the costimulatory molecules in GM/DCs generated from C/EBP β ^{-/-} mice. Importantly, our study shows for the first time that C/EBP β is responsible for the low expression of the costimulatory molecules in tolerogenic GM/DCs. Other reports showed that other transcription factors such as RelB is implicated in the expression of costimulatory molecules in DCs (Li *et al.*, 2007; Shih *et al.*, 2012). We have previously demonstrated that RelB is not found in the NF- κ B complex that binds DNA in GM/DCs suggesting that RelB does not regulate the expression of costimulatory molecules in GM/DCs (Guindi *et al.*, 2012). Our results indicate that C/EBP β is a key transcription factor that regulates the expression of costimulatory molecules in tolerogenic semimature GM/DCs.

Classical C/EBP binding sites are found in many cytokine promoters such as those of the IL-12p40, GM-CSF and IL-6 genes, while CREB regulates the expression of genes such as IL-10 (Platzer *et al.*, 1999; Plevy *et al.*, 1997; Poli, 1998; van Dijk *et al.*, 1999; Wen *et al.*, 2010). In GM/DCs, GSK3 inhibition reduced C/EBP β DNA binding activity but did not affect CREB DNA binding activity. Interestingly, GSK3 inhibition increased CREB transcriptional activity due to a decrease of CREB phosphorylation Ser129 (Larabee *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2005). GSK3 inhibition in GM/DCs resulted in increased IL-10 production, and significantly reduced IL-12 production. These data are consistent with a study showing that GSK3 inhibition in human monocytes reduces the production of proinflammatory cytokines such as IL-12 and IL-6 while increasing IL-10 production in response to TLR stimulation (Martin *et al.*, 2005). Thus, CREB and C/EBP β seem to act as the main targets of the GSK3 kinase in immune cells, at least in the myeloid lineage. Importantly, p38 MAPK inhibition in GM/DCs led to a drastic reduction in both CREB and C/EBP β DNA binding activities and resulted in both loss of IL-10 production and increased production of IL-12p70, reaching similar expression levels that observed in IL-4/DCs. Taken together, our results demonstrate for the first time that p38 and GSK3 kinases are involved in the regulation of C/EBP β and CREB pathways in tolerogenic DCs.

Although the preceding results pointed toward a role for C/EBP β in the regulation of tDC function, the generation of BMDCs from C/EBP β knockout mice convincingly confirmed its role

in the regulation of cytokine production by tDCs. Indeed, GM/DCs from *C/EBPβ*^{-/-} mice were found to express lesser amounts of IL-10 mRNA expression and to secrete lower levels of the corresponding protein after a 24-h stimulation with LPS than GM/DCs from wild-type mice. However, *C/EBPβ* deficiency did not affect the late IL-10 production, showing that *C/EBPβ* is necessary for early expression and production of IL-10, whereas CREB can be postulated to mediate the late IL-10 gene expression, based on the inhibitor data provided herein, as well as the the literature (Elcombe *et al.*, 2013; Mellett *et al.*, 2011) . In addition, *C/EBPβ* was shown to be critical for production of IL-12 and IL-6 since the secretion of these cytokines was drastically reduced in *C/EBPβ*^{-/-} GM/DCs. Previous work showed that IL-6 synthesis was not affected in *C/EBPβ*^{-/-} macrophages and that *C/EBPδ* compensated the lack of *C/EBPβ* for IL-6 production (Screpanti *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1995). Since LPS-stimulated GM/DCs produced IL-6 in the absence of *C/EBPδ* DNA binding activity, this suggests that the inhibition of the IL-6 production observed in *C/EBPβ*^{-/-} GM/DCs is not compensated by other *C/EBP* isoforms, and in turn indicates that *C/EBPδ* is probably not involved in IL-6 production by tolerogenic DCs. Thus, our results reveal the importance of *CEBPβ* in regulating cytokine gene expression in tDCs.

In summary, our study reveals *C/EBPβ* as a master regulator of tDCs function, and identifies a critical role for the p38 and *C/EBPβ* in the regulation of IL-10 and IL-12p70 production, as well as in the maturation status, of bone marrow-derived tolerogenic semi-mature GM/DCs. Our findings highlight novel molecular mechanisms modulating the anti- and pro-inflammatory balance of DCs, that could be targeted to control the immune responses. In particular, we identified key signaling molecules involved in the regulation of important features of tolerogenic DCs, namely p38 MAPK and GSK3. In a therapeutic perspective, inducing *C/EBPβ* activation in DCs *in vivo* could help restore immune tolerance by promoting a population of tolerogenic DCs that are beneficial to prevent autoimmune diseases such as type I diabetes.

6.1.8 References

- Ardeshtna, K. M., A. R. Pizzey, S. Devereux, and A. Khwaja. 2000. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96:1039-1046.
- Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
- Besin, G., S. Gaudreau, M. Menard, C. Guindi, G. Dupuis, and A. Amrani. 2008. Thymic stromal lymphopoietin and thymic stromal lymphopoietin-conditioned dendritic cells induce regulatory T-cell differentiation and protection of NOD mice against diabetes. *Diabetes* 57:2107-2117.
- Beurel, E., and R. S. Jope. 2008. Differential regulation of STAT family members by glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 283:21934-21944.
- Boyle, W. J., T. Smeal, L. H. Defize, P. Angel, J. R. Woodgett, M. Karin, and T. Hunter. 1991. Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* 64:573-584.
- Bradley, M. N., L. Zhou, and S. T. Smale. 2003. C/EBPbeta regulation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Mol Cell Biol* 23:4841-4858.
- Bullock, B. P., and J. F. Habener. 1998. Phosphorylation of the cAMP response element binding protein CREB by cAMP-dependent protein kinase A and glycogen synthase kinase-3 alters DNA-binding affinity, conformation, and increases net charge. *Biochemistry* 37:3795-3809.
- Burkly, L., C. Hession, L. Ogata, C. Reilly, L. A. Marconi, D. Olson, R. Tizard, R. Cate, and D. Lo. 1995. Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 373:531-536.
- Cassel, T. N., and M. Nord. 2003. C/EBP transcription factors in the lung epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L773-781.
- Centrella, M., S. Christakos, and T. L. McCarthy. 2004. Skeletal hormones and the C/EBP and Runx transcription factors: interactions that integrate and redefine gene expression. *Gene* 342:13-24.
- Chorny, A., E. Gonzalez-Rey, A. Fernandez-Martin, D. Pozo, D. Ganea, and M. Delgado. 2005. Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells with therapeutic effects on autoimmune disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13562-13567.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, and B. A. Hemmings. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789.

- Csoka, B., Z. H. Nemeth, L. Virag, P. Gergely, S. J. Leibovich, P. Pacher, C. X. Sun, M. R. Blackburn, E. S. Vizi, E. A. Deitch, and G. Hasko. 2007. A2A adenosine receptors and C/EBPbeta are crucially required for IL-10 production by macrophages exposed to *Escherichia coli*. *Blood* 110:2685-2695.
- Dillon, S., A. Agrawal, T. Van Dyke, G. Landreth, L. McCauley, A. Koh, C. Maliszewski, S. Akira, and B. Pulendran. 2004. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol* 172:4733-4743.
- Elcombe SE, Naqvi S, Van Den Bosch MW, MacKenzie KF, Cianfanelli F, Brown GD, Arthur JS. 2013. Dectin-1 regulates IL-10 production via a MSK1/2 and CREB dependent pathway and promotes the induction of regulatory macrophage markers. *PLoS One* 8:e60086.
- Escors, D., L. Lopes, R. Lin, J. Hiscott, S. Akira, R. J. Davis, and M. K. Collins. 2008. Targeting dendritic cell signaling to regulate the response to immunization. *Blood* 111:3050-3061.
- Feili-Hariri, M., and P. A. Morel. 2001. Phenotypic and functional characteristics of BM-derived DC from NOD and non-diabetes-prone strains. *Clin Immunol* 98:133-142.
- Fiol, C. J., J. S. Williams, C. H. Chou, Q. M. Wang, P. J. Roach, and O. M. Andrisani. 1994. A secondary phosphorylation of CREB341 at Ser129 is required for the cAMP-mediated control of gene expression. A role for glycogen synthase kinase-3 in the control of gene expression. *J Biol Chem* 269:32187-32193.
- Friedman, A. D. 2007. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 26:6816-6828.
- Gaudreau, S., C. Guindi, M. Menard, A. Benabdallah, G. Dupuis, and A. Amrani. 2010. GM-CSF induces bone marrow precursors of NOD mice to skew into tolerogenic
- Gaudreau, S., C. Guindi, M. Menard, G. Besin, G. Dupuis, and A. Amrani. 2007. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prevents diabetes development in NOD mice by inducing tolerogenic dendritic cells that sustain the suppressive function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 179:3638-3647.
- Gorgoni, B., D. Maritano, P. Marthyn, M. Righi, and V. Poli. 2002. C/EBP beta gene inactivation causes both impaired and enhanced gene expression and inverse regulation of IL-12 p40 and p35 mRNAs in macrophages. *J Immunol* 168:4055-4062.
- Gotschel, F., C. Kern, S. Lang, T. Sparna, C. Markmann, J. Schwager, S. McNelly, F. von Weizsacker, S. Laufer, A. Hecht, and I. Merfort. 2008. Inhibition of GSK3 differentially modulates NF-kappaB, CREB, AP-1 and beta-catenin signaling in hepatocytes, but fails to promote TNF-alpha-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 314:1351-1366.

Grimes, C. A., and R. S. Jope. 2001. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *J Neurochem* 78:1219-1232.

Guindi, C., M. Menard, A. Cloutier, S. Gaudreau, G. Besin, P. Larivee, P. P. McDonald, G. Dupuis, and A. Amrani. 2012. Differential role of NF-kappaB, ERK1/2 and AP-1 in modulating the immunoregulatory functions of bone marrow-derived dendritic cells from NOD mice. *Cell Immunol* 272:259-268.

Harris, J., S. A. De Haro, S. S. Master, J. Keane, E. A. Roberts, M. Delgado, and V. Deretic. 2007. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity* 27:505-517.

Huang, Q., D. Liu, P. Majewski, L. C. Schulte, J. M. Korn, R. A. Young, E. S. Lander, and N. Hacohen. 2001. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* 294:870-875.

Inaba, K., M. Inaba, M. Naito, and R. M. Steinman. 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 178:479-488.

Jansen, A., Homo-Delarche, F., Hooijkaas, H., Leenen, P.J., Dardenne, M., and Drexhage, H.A. (1994). Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes* 43, 667-675.

Kim, J. W., Q. Q. Tang, X. Li, and M. D. Lane. 2007. Effect of phosphorylation and S-S bond-induced dimerization on DNA binding and transcriptional activation by C/EBPbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1800-1804.

Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 1:311-316.

Larabee, J. L., F. J. Maldonado-Arocho, S. Pacheco, B. France, K. DeGiusti, S. M. Shakir, K. A. Bradley, and J. D. Ballard. 2011. Glycogen synthase kinase 3 activation is important for anthrax edema toxin-induced dendritic cell maturation and anthrax toxin receptor 2 expression in macrophages. *Infect Immun* 79:3302-3308.

Li, M., X. Zhang, X. Zheng, D. Lian, Z. X. Zhang, W. Ge, J. Yang, C. Vladau, M. Suzuki, D. Chen, R. Zhong, B. Garcia, A. M. Jevnikar, and W. P. Min. 2007. Immune modulation and tolerance induction by RelB-silenced dendritic cells through RNA interference. *J Immunol* 178:5480-5487.

Liu, Y. W., H. P. Tseng, L. C. Chen, B. K. Chen, and W. C. Chang. 2003. Functional cooperation of simian virus 40 promoter factor 1 and CCAAT/enhancer-binding protein beta and delta in lipopolysaccharide-induced gene activation of IL-10 in mouse macrophages. *J Immunol* 171:821-828.

- Loscher, C. E., E. Draper, O. Leavy, D. Kelleher, K. H. Mills, and H. M. Roche. 2005. Conjugated linoleic acid suppresses NF-kappa B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction. *J Immunol* 175:4990-4998.
- Lutz, M. B., and G. Schuler. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 23:445-449.
- Martin, M., K. Rehani, R. S. Jope, and S. M. Michalek. 2005. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol* 6:777-784.
- McColl, S. R. 2002. Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance. *Immunol Cell Biol* 80:489-496.
- Mellet M, Atzei P, Jackson R, O'Neill LA, Moynagh PN. Mal mediates TLR-induced activation of CREB and expression of IL-10. *J Immunol* 186:4925-35.
- Nerlov, C. 2008. C/EBPs: recipients of extracellular signals through proteome modulation. *Curr Opin Cell Biol* 20:180-185.
- Niehof, M., M. P. Manns, and C. Trautwein. 1997. CREB controls LAP/C/EBP beta transcription. *Mol Cell Biol* 17:3600-3613.
- Ouaaz, F., J. Arron, Y. Zheng, Y. Choi, and A. A. Beg. 2002. Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity* 16:257-270.
- Park, J. M., F. R. Greten, A. Wong, R. J. Westrick, J. S. Arthur, K. Otsu, A. Hoffmann, M. Montminy, and M. Karin. 2005. Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis--CREB and NF-kappaB as key regulators. *Immunity* 23:319-329.
- Piwnien-Pilipuk, G., O. MacDougald, and J. Schwartz. 2002. Dual regulation of phosphorylation and dephosphorylation of C/EBPbeta modulate its transcriptional activation and DNA binding in response to growth hormone. *J Biol Chem* 277:44557-44565.
- Poli, V. 1998. The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem* 273:29279-29282.
- Poligone, B., D. J. Weaver, Jr., P. Sen, A. S. Baldwin, Jr., and R. Tisch. 2002. Elevated NF-kappaB activation in nonobese diabetic mouse dendritic cells results in enhanced APC function. *J Immunol* 168:188-196.
- Puig-Kroger, A., M. Relloso, O. Fernandez-Capetillo, A. Zubiaga, A. Silva, C. Bernabeu, and A. L. Corbi. 2001. Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* 98:2175-2182.

Ramji, D. P., and P. Foka. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365:561-575.

Rescigno, M., M. Martino, C. L. Sutherland, M. R. Gold, and P. Ricciardi-Castagnoli. 1998. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* 188:2175-2180.

Rodionova, E., M. Conzelmann, E. Maraskovsky, M. Hess, M. Kirsch, T. Giese, A. D. Ho, M. Zoller, P. Dreger, and T. Luft. 2007. GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells. *Blood* 109:1584-1592.

Ross, H. L., M. R. Nonnemacher, T. H. Hogan, S. J. Quiterio, A. Henderson, J. J. McAllister, F. C. Krebs, and B. Wigdahl. 2001. Interaction between CCAAT/enhancer binding protein and cyclic AMP response element binding protein 1 regulates human immunodeficiency virus type 1 transcription in cells of the monocyte/macrophage lineage. *J Virol* 75:1842-1856.

Ruffell, D., F. Mourkioti, A. Gambardella, P. Kirstetter, R. G. Lopez, N. Rosenthal, and C. Nerlov. 2009. A CREB-C/EBP β cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:17475-17480.

Rutella, S., G. Bonanno, L. Pierelli, A. Mariotti, E. Capoluongo, A. M. Contemi, F. Ameglio, A. Curti, D. G. De Ritis, M. T. Voso, A. Perillo, S. Mancuso, G. Scambia, R. M. Lemoli, and G. Leone. 2004. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the generation of regulatory DC through induction of IL-10 and IFN- α . *Eur J Immunol* 34:1291-1302.

Sato, K., N. Yamashita, and T. Matsuyama. 2002. Human peripheral blood monocyte-derived interleukin-10-induced semi-mature dendritic cells induce anergic CD4(+) and CD8(+) T cells via presentation of the internalized soluble antigen and cross-presentation of the phagocytosed necrotic cellular fragments. *Cell Immunol* 215:186-194.

Schrem, H., J. Klempnauer, and J. Borlak. 2004. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part II: the C/EBPs and D site-binding protein in cell cycle control, carcinogenesis, circadian gene regulation, liver regeneration, apoptosis, and liver-specific gene regulation. *Pharmacol Rev* 56:291-330.

Screpanti, I., L. Romani, P. Musiani, A. Modesti, E. Fattori, D. Lazzaro, C. Sellitto, S. Scarpa, D. Bellavia, G. Lattanzio, and et al. 1995. Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP β -deficient mice. *Embo J* 14:1932-1941.

Shih, V. F., J. Davis-Turak, M. Macal, J. Q. Huang, J. Ponomarenko, J. D. Kearns, T. Yu, R. Fagerlund, M. Asagiri, E. I. Zuniga, and A. Hoffmann. 2012. Control of RelB during dendritic cell activation integrates canonical and noncanonical NF- κ B pathways. *Nat Immunol* 13:1162-1170.

Smink, J. J., and A. Leutz. 2010. Rapamycin and the transcription factor C/EBPbeta as a switch in osteoclast differentiation: implications for lytic bone diseases. *J Mol Med (Berl)* 88:227-233.

Steinbrink, K., E. Graulich, S. Kubsch, J. Knop, and A. H. Enk. 2002. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 99:2468-2476.

Steinbrink, K., M. Wolfl, H. Jonuleit, J. Knop, and A. H. Enk. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159:4772-4780.

Steinman, R. M., D. Hawiger, and M. C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685-711.

Tanaka, T., S. Akira, K. Yoshida, M. Umemoto, Y. Yoneda, N. Shirafuji, H. Fujiwara, S. Suematsu, N. Yoshida, and T. Kishimoto. 1995. Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell* 80:353-361.

Tang, Q. Q., M. Gronborg, H. Huang, J. W. Kim, T. C. Otto, A. Pandey, and M. D. Lane. 2005. Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9766-9771.

van Vliet, S. J., J. den Dunnen, S. I. Gringhuis, T. B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2007. Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr Opin Immunol* 19:435-440.

Wakkach, A., N. Fournier, V. Brun, J. P. Breittmayer, F. Cottrez, and H. Groux. 2003. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18:605-617.

Wu, L., A. D'Amico, K. D. Winkel, M. Suter, D. Lo, and K. Shortman. 1998. RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity* 9:839-847.

Yi, A. K., J. G. Yoon, S. J. Yeo, S. C. Hong, B. K. English, and A. M. Krieg. 2002. Role of mitogen-activated protein kinases in CpG DNA-mediated IL-10 and IL-12 production: central role of extracellular signal-regulated kinase in the negative feedback loop of the CpG DNA-mediated Th1 response. *J Immunol* 168:4711-4720.

7 Chapitre 4. Implication de la PI3K dans les fonctions des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse générées en présence de GM-CSF

7.1 Introduction

Afin de mieux comprendre l'implication du facteur de transcription C/EBP dans les fonctions des DCs tolérogènes, nous avons étudié l'impact que pourrait avoir une suractivation de ce facteur de transcription sur les fonctions des DCs tolérogènes. Des études ont montré que la PI3K peut inhiber l'activation de la GSK3 (Cohen et Frame, 2001). Comme nous l'avons démontré dans le chapitre précédent, l'inhibition de la GSK3 diminue la phosphorylation ainsi que la liaison à l'ADN de C/EBP β . En inhibant la PI3K, nous voulions étudier l'effet de la suractivation de C/EBP β dans les diverses fonctions des DCs tolérogènes.

7.2 Matériel et méthodes:

7.2.1 Souris

Les souris mâles NOD ont été achetées chez Taconic (Germantown, New York, USA). Les souris 8.3-NOD ont été obtenues du Dr Pere Santamaria (University of Calgary, Calgary, Canada). Les souris NOD.BDC2.5 proviennent de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). Les souris NOD.BDC2.5Foxp3KI ont été générées par le croisement des souris NOD.BDC2.5 et NOD.FoxP3KI (obtenues de Dr Mohamed Oukka, Washington University). Les souris C/EBP $\beta^{-/-}$ et C/EBP $\beta^{+/+}$ ont été obtenues du Dr Peter F. Johnson par l'entremise du Dr Claude Asselin. Toutes les souris sont maintenues dans un environnement sans pathogène à l'animalerie de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke selon les normes du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA).

7.2.2 Génération des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDCs)

Les BMDC ont été générées à partir de souris NOD et cultivées dans du RPMI 1640 (Sigma) complémenté avec 50 U/ml de pénicilline/streptomycine, 2 mM de L-Glutamine, 50 μ M 2-

mercaptoéthanol, et 10% de sérum foetal bovin (FBS). Les BMDC ont été cultivées à une densité de 10×10^6 cellules/10 ml/pétri avec 5 ng/ml de GM-CSF recombinant de souris (rmGM-CSF, R&D systems), avec ou sans 4.5 ng/ml interleukine-4 (IL-4, R&D systems). Au troisième jour, 10 ml de milieu de culture frais contenant du rmGM-CSF avec ou sans IL-4 a été ajouté à chaque pétri. Au cinquième jour de culture, la moitié du milieu est retirée et est remplacée avec du milieu frais contenant du rmGM-CSF avec ou sans IL-4. Au septième jour de culture, les DCs ont été récupérées, puis pré-incubées 1 heure avec différents inhibiteurs de kinases (SB203580 (10 μ M) ou SB216763 (10 μ M), ou LY294002 (10 μ M) ou GF109203X (2 μ M) ou DMSO (contrôle)) avant d'être stimulées avec du LPS (1 μ g/ml) dans de nouveaux pétris de culture pendant 48 heures.

7.2.3 Anticorps et marquages des cellules pour l'analyse par cytométrie de flux

Les BMDCs et les lymphocytes T ont été récupérés, lavés et marqués avec des anticorps tel que décrit dans les légendes des figures. Les acquisitions des cellules ont été effectuées à l'aide d'un FACSCalibur (Becton Dickinson) ou d'un FACSCanto (BD Biosciences). Les analyses ont été effectuées grâce au logiciel CellQuest ProTM (BD Biosciences) et FlowJo (Tree Star).

Les anticorps monoclonaux couplés à la biotine anti-CD86 (B7-1) (clone 16-10A1), anti-CD80 (B7-2) (clone GL1), et anti-CD11c (clone HL3) ont été achetés chez BD Pharmingen. Les anticorps anti-CD11c (clone N418), anti-CD40 (clone 1C10) anti-IFN γ (XMG1.2), anti-IL-17 (clone eBio17B7), anti-CD25 (clone PC61.5), anti-CD4 (clone L3T4) et ROR γ T (clone AFKJS-9) ont été achetés chez eBiosciences. Un anticorps provenant de chèvre marqué à la fluorescéine et dirigé contre les IgG de rat est utilisé comme anticorps secondaire (Pierce). Pour les marquages intracellulaires, les cellules ont été fixées avec la paraformaldéhyde (4%) pendant 20 minutes à 4°C et perméabilisées avec la solution de perméabilisation de BD Biosciences. Par la suite, les marquages ont été réalisés avec les anticorps dans cette même solution de perméabilisation.

7.2.4 Essai d'activation des lymphocytes T

Les BMDCs ont été récoltées et irradiées à 2400 Gy puis pulsées avec des concentrations variant de 0,001 à 1,0 μ g/ml du peptide NRP-A7 (KYNKANAF_L), reconnu spécifiquement par les

lymphocytes T CD8⁺ de souris 8.3-NOD, ou du peptide contrôle TUM (KYQAVTTTL). Dans une autre série d'expériences, les BMDCs ont été pulsées avec des concentrations variant de 0.0025 à 0.25 µg/ml du mimotope 1040-31 (Cedarlane, Burlington, ON) spécifique pour les lymphocytes T de souris NOD.BDC2.5.

Les BMDCs ont été mises en culture dans une plaque 96 puits à fond rond à une densité de 5×10^3 cellules par puits. Les lymphocytes T CD8⁺ ont été purifiés à partir de la rate de souris transgéniques 8.3-NOD à l'aide de billes magnétiques (Miltenyi Biotec) en suivant les instructions du manufacturier, et ont été ajoutés (2×10^4 cellules/puits) aux cellules dendritiques puis incubés à 37°C. Les mêmes expériences ont été réalisées avec les lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ purifiés par tri cellulaire (FACS Aria) de souris NOD.BDC2.5. Après 48 heures, les surnageants ont été récupérés (pour la quantification des cytokines produites) et remplacés par du milieu frais contenant 1 µCi thymidine tritiée. Après 16 heures de culture, l'incorporation de thymidine tritiée a été mesurée grâce à un compteur de rayonnement β.

7.2.5 Immunobuvardage de type Western

Les BMDCs ont été lavées avec du PBS (2 fois) puis lysées dans un tampon contenant 50 mM de Tris, 0,15 M de NaCl, 1 mM de DTT, 1 % de Triton X-100, 1 mM d'AEBSF, 1 mM de PMSF, 10 mM de NaF, 2 mM de Na₃VO₄, 2 mM de NaPPi, 10 µg/ml de leupeptine/pepstatine A, 10 µg/ml d'aprotinine. Les lysats cellulaires ainsi obtenus ont été séparés sur un gel SDS-PAGE 10% et transférés sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-ECL, Amersham Biosciences). Les membranes ont été ensuite bloquées pendant une heure à température ambiante avec du TBS-T contenant 5% de lait et hybridées toute la nuit avec les anticorps primaires dirigés contre les protéines pGSK3 et β-actine (Cell Signaling) dans une solution de TBS-T contenant 5% BSA. Les membranes ont été ensuite hybridées avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP) et la liaison des anticorps a été révélée par chimioluminescence (GE Healthcare).

7.2.6 Fractionnement cellulaire et extraction nucléaires

Les BMDC ont été récupérées puis centrifugées à 500 X g pour 10 minutes à 4°C. Les culots cellulaires ont été resuspendus dans un tampon froid (10 mM de Tris-Base, pH 7,4, 10 mM de NaCl, 3 mM de MgCl₂, 0,5 mM de EGTA, 0,5 mM de EDTA, 0,5 mM de DTT) contenant 1 mM de PMSF, 1 mM de AEBSF, 10 µg/ml d'aprotinine, de leupeptine et de pepstatine A, 10 mM de NaF, 1 mM de Na₃VO₄, 10 mM de Na₄P₂O₇. Les cellules ont été incubées sur glace pendant 10 minutes puis un volume égal du même tampon a été ajouté aux cellules, mais contenant cette fois-ci 0,2 % de NP-40. Les cellules ont été vortexées immédiatement pendant 15 secondes et centrifugées à 1500 X g pendant 5 minutes, à 4°C. Le surnageant a été récupéré et représente la fraction cytoplasmique des cellules. L'extraction nucléaire a été effectuée en lavant le culot ainsi obtenu et en le resuspendant dans un tampon de lyse contenant 10% glycérol. Le NaCl a ensuite été rajouté pour obtenir une concentration finale de 400 mM. Suite à une incubation de 20 minutes sur glace avec agitation occasionnelle, les extraits nucléaires ont été centrifugés à 13,000 X g pendant 15 minutes, à 4°C. Le surnageant contenant les protéines nucléaires a été récupéré et immédiatement congelé à -80°C.

7.2.7 Gel de retardement (EMSA)

Les extraits nucléaires (2 à 5 µg) ont été ajoutés à un tampon de liaison (20 mM de Tris-Base pH 7,5, 50 mM de KCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 0.1% de NP40, 5% de glycérol, 6 µg de BSA acétylé et 0,8 µg de poly dI-dC) pour obtenir un volume final de 18 µl. Ensuite, 10 fmoles (dans un volume final de 2 µl) d'oligonucléotide marqué au ³²P ont été ajoutés à la réaction (réaction de liaison) et le tout a été incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Pour les essais de compétition et l'identification des protéines liant l'ADN («supershift»), la réaction de liaison a été effectuée en présence d'une sonde non marquée ou en présence d'un anticorps spécifique, pour 20 minutes à 4°C. Par la suite, l'oligonucléotide marqué a été ajouté à la réaction. Les échantillons ainsi obtenus ont été soumis à une électrophorèse sur un gel natif d'acrylamide à 5.5% à 4°C dans du TBE 0.5X. Le gel a ensuite été séché puis exposé par autoradiographie à -70°C pendant environ 16 heures. Les séquences des oligonucléotides double-

brin utilisés pour les EMSA sont pour AP-1 (5'CGCTTGATGAGTCAGCCGG-AA-3'), CREB (5'-AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG-3') et C/EBP (5'-TGCAGATTGCGCAATCTGCA-3'). Ces oligonucléotides représentent les séquences consensus de liaison et provenaient pour AP-1 et CREB de Promega (Madison, WI) et pour C/EBP de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). L'oligonucléotide utilisé pour la détection de la liaison de NF- κ B contient les sites NF- κ B répétés en tandem du LTR du HIV-1 (5'-GATCAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCC-3').

7.2.8 Production de cytokines par les BMDCs

Les BMDC immatures ont été récoltées après 7 jours de différenciation et cultivées dans des plaques à 96 puits à une densité de 1×10^6 cellules/ml puis stimulées avec du LPS à une concentration de 1 μ g/ml pour 24 ou 48 heures. Les surnageants ont ensuite été récoltés puis analysés par ELISA pour la production d'IL-10, d'IL-12p70, d'IL-12p40, d'IL-6, d'IL-23, d'IL-17, d'IL-2 et d'IFN- γ selon le protocole fourni par le manufacturier (R & D Systems). Brièvement, la plaque (Nunc, Thermo Fisher Scientific) est enduite avec l'anticorps de capture pendant 16 heures à température ambiante. Par la suite, la plaque est lavée et bloquée avec une solution de sucrose 5% et de BSA 1% ou une solution 1% BSA. Les échantillons à doser sont ensuite déposés dans les puits et incubés deux heures à température ambiante. Après un cycle de trois lavages, l'anticorps de détection couplé à la biotine est déposé dans les puits pour une durée de deux heures à température ambiante. Par la suite, la plaque est lavée à nouveau et la streptavidine-HRP est ajoutée pour une durée de 20 minutes. Après un autre cycle de lavage, le substrat (mélange 1:1 de H₂O₂ et de Tétraméthylbenzidine) est ajouté et la réaction est arrêtée par l'ajout d'acide phosphorique. La lecture de la plaque est effectuée à la longueur d'onde 450 nm en soustrayant la lecture obtenue à 570 nm.

7.2.9 Extraction de l'ARNm et analyse des cDNA par PCR en temps réel

Pour chaque condition expérimentale, l'ARN total a été isolé à partir de 5×10^6 BMDCs en utilisant le TRIzol (Invitrogen, Burlington, Ont., Canada). Brièvement, suite à une préincubation de 1 heure avec les différents inhibiteurs ou avec le véhicule et une stimulation au LPS de 4 ou 12

heures, les cellules ont été centrifugées et resuspendues dans 1 ml de TRIzol. La phase aqueuse obtenue suite à l'ajout de chloroforme a été transférée dans un nouveau tube puis l'ARN a été précipité par l'ajout d'isopropanol. L'ARN a été lavé à l'éthanol, resuspendu dans de l'eau puis dosé par spectrométrie. L'ARN (1 μ g) ainsi purifié est converti en cDNA en utilisant la Superscript II (Invitrogen). Le cDNA est ensuite utilisé pour faire du PCR en temps réel. Les amorces utilisées ainsi que la température d'hybridation (T_m) utilisée pour chaque gène sont présentées dans le tableau 1. Les conditions de PCR sont: 95°C pour 5 min, suivi de 35 cycles (94°C pour 30 s, T_m pour 45s, 72°C pour 60s). Les graphiques d'amplifications ont été générés avec le logiciel Rotor-Gene Amplification v6.0 (Corbett Research). La méthode $\Delta\Delta C_t$ a été utilisée pour l'analyse des résultats en utilisant la β -actine comme gène de référence.

Gène d'intérêt	Amorce sens	Amorce anti-sens	T_m (°C)
IL-12p35	CTC CTA AAC CAC CTC AGT TTG GCC AGG GTC	TAG ATG CTA CAA GGC ACA GGG TCA TCA TC	60
IL-12p40	CAC TCA TGG CCA TGT GGG AGC TGG AGA AAG	TCC GGA GTA ATT TGG TGC CTT CAC ACC TCA G	60
IL-10	TAC CTG GTA GAA GTG ATG CC	CAT CAT GTA TGC TTC TAT GC	64
TGF β -1	TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG G	GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC	64
IL-23p19	GCC CCG TAT CCA GTG TGA	GCT GCC ACT GCT GAC TAG	56,5
β -actin	ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA	TCA TGG ATG CCA CAG GAT TC	de 55 65

Tableau 1. Amorces utilisées dans les réactions de PCR en temps réel.

Ce tableau présente les différentes amorces ainsi que la température utilisée pour chaque réaction de PCR.

7.2.10 Conversion des lymphocytes T naïfs en Th17

Les GM/DCs ont été générées tel que mentionné plus haut et pré-incubées 1 heure avec du LY294002 ou du DMSO avant d'être stimulées au LPS pour 8 heures. Les GM/DCs (1×10^5 cellules/ puits) ont ensuite été co-cultivées avec des lymphocytes T $CD4^+CD25^-$ ou $CD4^+CD25^+$ isolés de souris NOD ou de souris NOD.BDC2.5 (1×10^5 cellules / puits). Pour ces co-culture, les plaques ont été recouvertes d'anti-CD3 (1 μ g/ml purifié dans notre laboratoire à partir du surnageant de l'hybridome OKT3) et d'anti-CD28 (2 μ g/ml R&D System). Lorsque des lymphocytes de souris NOD.BDC2.5 ont été utilisés, les BMDCs ont été pulsées avec 0,5 μ g/ml du mimotope 1040-31, en remplacement de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28. Le contrôle négatif des conversions des lymphocytes T naïfs en Th17 consiste en des lymphocytes T cultivés en présence d'anti-CD3 et d'anti-CD28 mais en absence de GM/DCs. Le contrôle positif des conversions des lymphocytes T naïfs en Th17 consiste en des lymphocytes T cultivés en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28, d'IL-6 (40 ng/ml Cedarlane), d'IL-23 (10 ng/ml, R&D Systems), de TGF- β (2,5 ng/ml, R&D Systems), d'anti-IL-4 (5 μ g/ml R&D Systems) et d'anti-IFN- γ (2,5 μ g/ml R&D Systems). Après 4 jours, les surnageants des co-cultures ont été prélevés pour des analyses par ELISA et remplacés par du milieu frais contenant de la Brefeldin A (eBioscience). Après 4 heures d'incubation, les cellules ont été récupérées puis des marquages de surface et intracellulaires ont été effectués, suivi d'une analyse par cytométrie en flux tel que décrit plus haut.

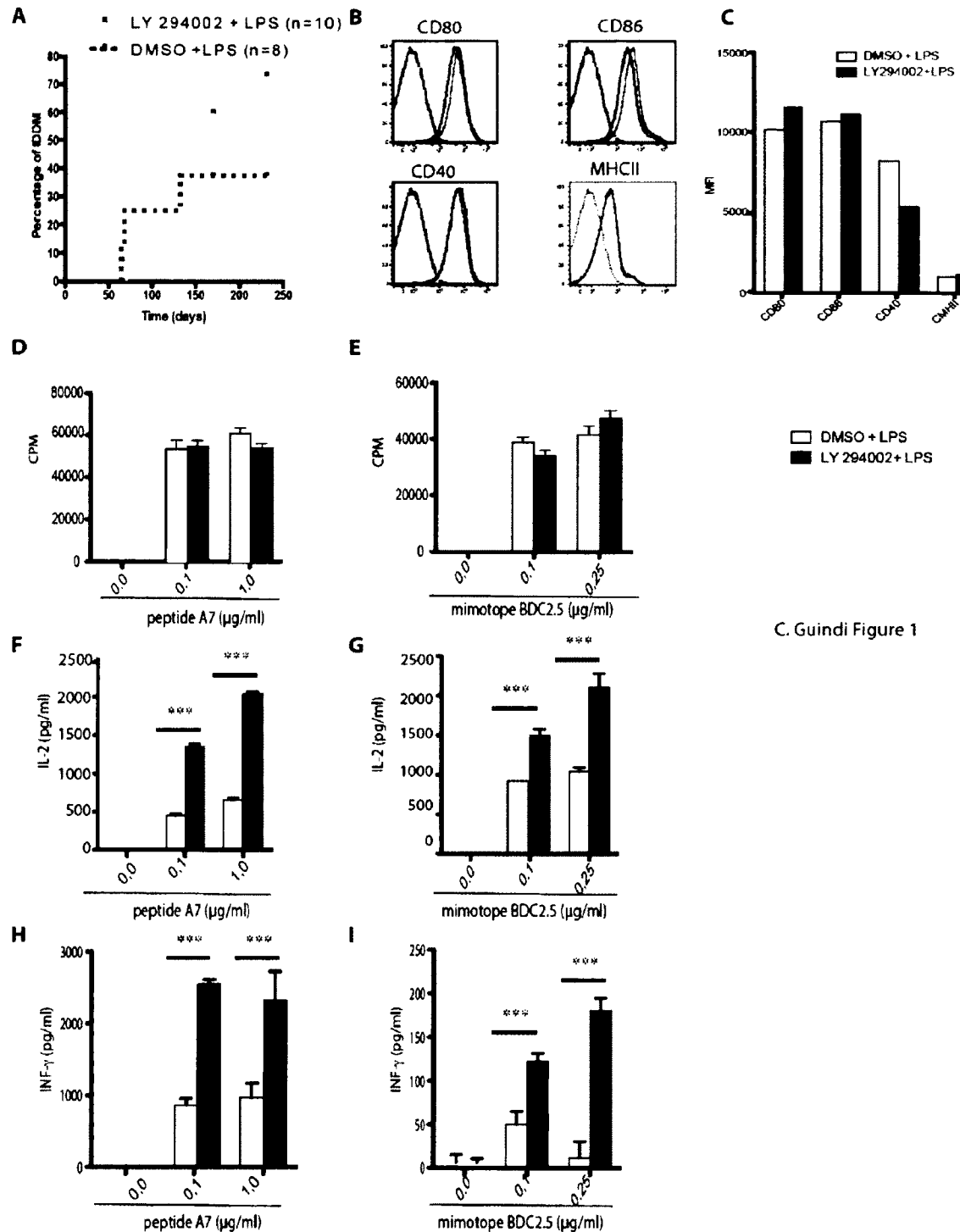
7.3 Résultats

7.3.1 Caractérisation des fonctions des GM/DCs lors de l'inhibition de la PI3K.

Afin de déterminer le rôle de la PI3K dans les fonctions tolérogènes des GM/DCs, nous avons généré des GM/DCs *in vitro* pendant 7 jours, puis nous les avons pré-incubées avec un inhibiteur de la PI3K, le LY294002 (10 μ M), ou le véhicule DMSO. Par la suite, les cellules ont été stimulées au LPS (1 μ g/ml) pendant 48 heures puis injectées par voie intraveineuse (5×10^6 cellules / souris) à des souris NOD âgées de trois semaines. La glycosurie des souris a ensuite été mesurée deux fois par semaine dans l'urine à l'aide de Uristix (Siemens). Les résultats présentés

en figure 1A montrent que 70% des souris ayant reçu des GM/DCs pré-incubées avec le LY294002 ont développé le diabète alors que seulement 38% des souris ayant reçu des GM/DCs pré-incubées avec le véhicule (DMSO) ont développé la maladie (n=10 et 8, respectivement). Ces résultats suggèrent que la PI3K joue un rôle important dans les fonctions tolérogènes des GM/DCs. Afin de mieux comprendre comment les différences entre les deux groupes de souris receveuses, nous avons étudié différentes caractéristiques clés des cellules dendritiques tolérogènes, soient leur résistance à la maturation, leur capacité à activer les lymphocytes, ainsi que leur production de cytokines. Pour ce qui est de la résistance à la maturation, nous avons comparé les niveaux d'expression des molécules de costimulation des cellules avant et après stimulation avec le LPS (48 h). Les résultats ne montrent pas de différences significatives pour ce qui est de l'expression de CD80, CD86, CD40 et du CMH de classe II, entre les cellules pré-incubées avec le LY294002 et le DMSO (Figure 1B et C). Ces résultats montrent donc que l'inhibition de la PI3K ne change pas le phénotype des DCs mais induit une perte des fonctions tolérogéniques des GM/DCs.

Une autre fonction tolérogène des GM/DCs est leur faible capacité à stimuler la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ comparativement aux IL-4/DCs. Nous avons donc évalué la capacité des GM/DCs à stimuler la prolifération des lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ lorsque la PI3K est inhibée ou non. Les lymphocytes T CD4⁺ ont été isolés de souris NOD BDC2.5 alors que les lymphocytes T CD8⁺ ont été isolés de souris 8.3-NOD. Aucune différence significative n'a été observée dans la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et des CD8⁺ (Figure 1 D et E) lorsque la PI3K est inhibée. Cependant, une augmentation de la production d'IL-2 est remarquée chez les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ lorsque la PI3K est inhibée chez les GM/DCs (Figure 1 F et G). De plus, une augmentation de la production d'IFN- γ est aussi observée chez les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ lorsque la PI3K est inhibée chez les GM/DCs (Figure 1 H et I). Ces résultats démontrent que l'inhibition de la PI3K induit chez les GM/DCs la capacité d'activer des lymphocytes T. Les taux de prolifération sont semblables, mais leur production de cytokines est affectée par cette inhibition.



C. Guindi Figure 1

Figure 1. Rôle de la PI3K dans les fonctions des DCs tolérigènes de souris NOD.

Les GM/DCs ont été pré-incubées 1 heure avec du DMSO ou du LY294002 (10µM) puis stimulées au LPS pendant 48 heures. 5x10⁶ GM/DCs ont été injectées i.v. à des souris NOD de 3 semaines d'âge et le développement du diabète a été suivi pendant 250 jours (A). (B) Analyse par

cytométrie de flux de l'expression des molécules de costimulation après 48 heures de stimulation au LPS, (ligne en pointillée: isotype contrôle ; ligne fine: GM/DCs pré-traitées au DMSO et ligne épaisse: GM/DCs pré-traitées au LY294002). (C) Graphique représentant l'intensité de fluorescence moyenne (MFI). Les DCs pré-incubées avec l'inhibiteur de PI3K ou le véhicule puis stimulées au LPS pour 48 heures (5×10^3 cellules) ont été pulsées avec le peptide NRP-A7 et co-cultivées avec les lymphocytes T CD8⁺ (2×10^4 cellules) purifiées de souris transgéniques 8.3-NOD pendant 72 heures. La prolifération a été mesurée par la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée lors des 16 dernières heures de la co-culture (D). (E) Analyse de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ purifiés de souris transgéniques NOD.BDC2.5 dans les mêmes conditions que celles des lymphocytes T CD8⁺. Avant l'ajout de thymidine, les surnageants des co-cultures ont été récupérés et les quantités d'IL-2 (F et G) et d'IFN- γ (H et I) produites par les lymphocytes ont été mesurées par ELISA. Les résultats sont représentatifs de 4-6 expériences. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD (***) $p < 0.001$).

7.3.2 Impact de l'inhibition de la PI3K sur l'activation des facteurs de transcription AP-1, CREB, NF- κ B et C/EBP

Une fonction importante des DCs tolérogènes est leur capacité à produire des cytokines anti-inflammatoires, telle que l'IL-10. Nous avons déjà démontré que le facteur AP-1 est impliqué dans la production d'IL-10 et que ce facteur n'est pas impliqué dans la maturation des DCs étant donné que lorsqu'il est inhibé, on ne remarque aucun effet sur l'expression des marqueurs de costimulation (Guindi *et al.*, 2012). Nous avons aussi démontré que p38 est essentielle pour la production d'IL-10 (Guindi C. *et al.*, soumis) et que l'inhibition de cette kinase diminue la liaison à l'ADN de CREB. Nos résultats montrent que l'inhibition de PI3K résulte aussi en une diminution de la liaison d'AP-1 et de CREB à l'ADN (Figure 2A, 2B). Nous avons également analysé la liaison de NF- κ B à l'ADN, eu égard à une étude précédente dans laquelle nous avons démontré que la forte activation de NF- κ B est impliquée dans la résistance à la maturation ainsi que dans la production d'IL-10 (Guindi *et al.*, 2012). Les résultats obtenus ne montrent aucun changement dans la liaison à l'ADN de NF- κ B lorsque la PI3K est inhibée (Figure 2C). Nous nous sommes enfin intéressés à la liaison de C/EBP à l'ADN, puisque nous avons déjà démontré que C/EBP β lie l'ADN chez les GM/DCs et que cette liaison est modulée par la GSK3 et p38 (Guindi C. et al soumis). La PI3K, par l'entremise de Akt, module l'activation de la GSK3 (Wang *et al.*, 2011b). Akt peut phosphoryler la GSK3 et donc inhiber son activité enzymatique. Nos résultats montrent une augmentation de la liaison à l'ADN de C/EBP lorsque la PI3K est inhibée (Figure 2D). Comme la GSK3 est une pierre angulaire dans la modulation de l'activité de différents facteurs de transcription, nous avons analysé les niveaux de phosphorylation de cette protéine. Les résultats montrent une diminution de la phosphorylation de la GSK3 lorsque la PI3K est inhibée (Figure 2E). Ces résultats établissent donc le lien entre la PI3K et la capacité de C/EBP β à se lier à l'ADN. Dans la figure 2E, l'inhibition de la PKC par le GF 109203X représente un contrôle positif puisque des résultats identiques ont été démontrés par un autre groupe (Chano et Descoteaux, 2002). De plus, l'inhibition de la p38 par le SB 203580 diminue fortement la phosphorylation de la GSK3 ce qui explique une fois de plus la diminution de la liaison à l'ADN de C/EBP β observée lorsque cette dernière est inhibée. En somme, les résultats de la figure 2 démontrent que la capacité des facteurs de transcription régulant l'expression de l'IL-10 à lier l'ADN est modulée par l'inhibition de la PI3K chez les GM/DCs.

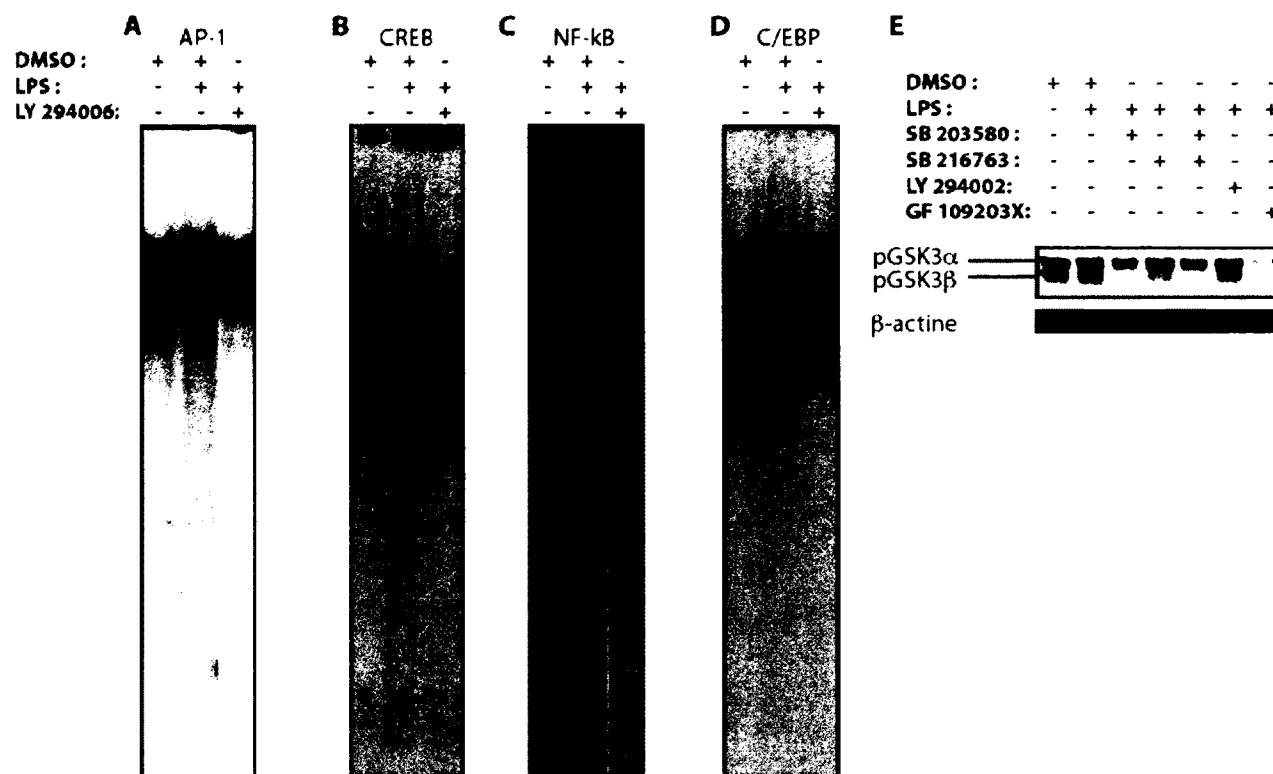


Figure 2. Modulation des voies de signalisation lors de l'inhibition de la PI3K chez les GM/DCs.

Les GM/DCs ont été pré-incubées 1 heure avec du DMSO ou avec du LY294002 (10 μ M) avant d'être stimulées au LPS (1 μ g/ml) pour 24 heures. Les extraits nucléaires ont ensuite été préparés et la capacité de liaison à l'ADN d'AP-1 (A), de CREB (B), de NF- κ B (C) et de C/EBP (D) a été analysée par EMSA. Les extraits cytoplasmiques obtenus dans les mêmes conditions ont ensuite été utilisés pour déterminer les niveaux de phosphorylation de la GSK3 par Western blot (SB 203580 est un inhibiteur de p38, SB 216763 est un inhibiteur de la GSK3, LY 294002 est un inhibiteur de la PI3K et le GF 109203X est un inhibiteur de la PKC (E). Les résultats montrés sont représentatifs de 2-3 expériences.

7.3.3 Modulation de l'expression génique et de la production de l'IL-10 et de l'IL-12 lors de l'inhibition de la PI3K

Comme la liaison à l'ADN de plusieurs facteurs de transcription impliqués dans l'expression de cytokines telle que l'IL-10 est modulée par la PI3K (Figure 2), nous avons analysé l'expression génique (ARNm) de différentes cytokines. Les cytokines que nous avons étudiées sont impliquées dans le diabète de type 1, ou sont importantes pour l'induction de la tolérance immunitaire. Pour ce faire, les GM/DCs ont été pré-incubées 1 heure avec le véhicule ou le LY294002 puis stimulées au LPS pendant 4 ou 12 heures et l'expression relative des gènes d'IL-10 et d'IL-12 a été mesurée par PCR en temps réel. Les résultats montrent une importante diminution de l'expression de l'ARNm de l'IL-10 lorsque la PI3K est inhibée après 4 heures (Figure 3A) et 12 heures (Figure 3B) de stimulation au LPS. L'effet de l'inhibition de la PI3K sur la production d'IL-10 par les DCs a été évalué après 24 heures de stimulation au LPS. Lorsque la PI3K est inhibée, on remarque une diminution drastique de la production d'IL-10 (Figure 3C). Ces résultats suggèrent une fois de plus l'existence d'un lien entre les facteurs de transcription CREB et AP-1 et la production d'IL-10, car l'inhibition de la PI3K diminue leur liaison à l'ADN et la production d'IL-10 chez les GM/DCs. Nous avons démontré que les DCs immunogéniques (IL-4DCs) de souris NOD produisent une quantité importante d'IL-12p70, tandis que les GM/DCs n'en produisent pas (Guindi *et al.*, 2012). Nous avons donc analysé l'expression génique de l'IL-12p35 et de l'IL-12p40 des GM/DCs lorsque la PI3K est inhibée. Les résultats présentés dans les figures 3D et 3E ne montrent aucune différence significative dans l'expression génique de l'IL-12p35 entre les GMDCs pré-incubées avec le véhicule ou l'inhibiteur de la PI3K. Cependant, l'expression génique de l'IL-12p40 est fortement augmentée après 4 heures de stimulation au LPS lorsque la PI3K est inhibée (Figure 3F). Après 12 heures de stimulation au LPS, on n'observe plus d'augmentation significative de l'expression de l'ARNm d'IL-12p40 chez les GM/DCs dans lesquelles la PI3K est inhibée (Figure 3G). Nous avons aussi mesuré la quantité d'IL-12p70 produite par ces cellules après 24 heures de stimulation au LPS. Aucune différence significative n'est observée dans la production de cette cytokine lorsque la PI3K est inhibée (Figure 3H). Comme attendu, les IL-4/DCs de souris NOD (contrôle positif) produisent des quantités supérieures d'IL-12p70 comparativement aux GM/DCs (Figure 3H). Ces résultats

montrent que l'inhibition de la PI3K affecte la production d'IL-10 et augmente la synthèse d'IL-12p40 sans changer les niveaux d'IL-12p70 produit.

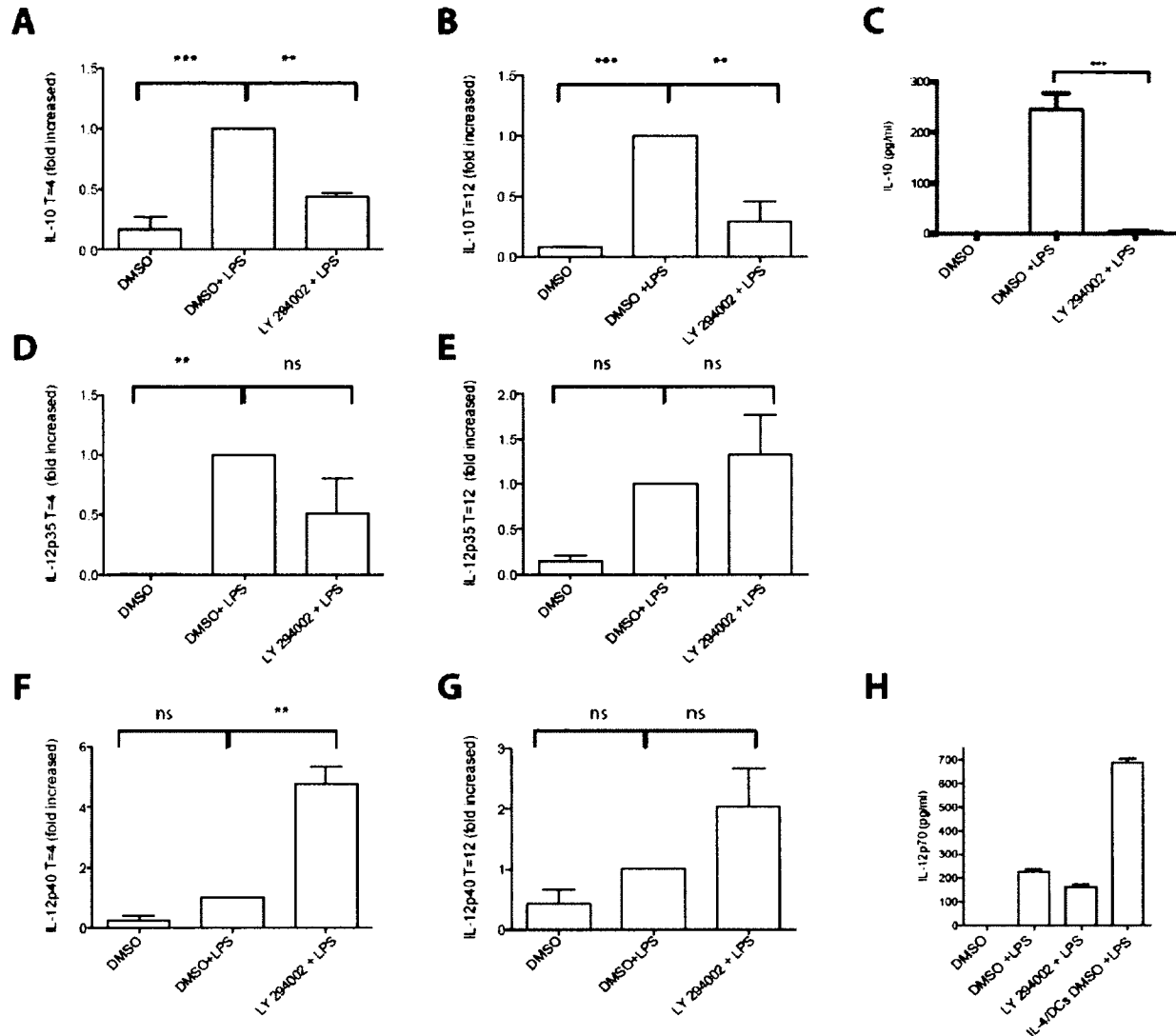


Figure 3. Effet de l'inhibition de la PI3K sur la modulation de l'expression génique et de la sécrétion des cytokines chez les GM/DCs.

Les GM/DCs ont été générées pendant 7 jours, pré-incubées avec du DMSO ou du LY294002 pendant 1 heure, puis stimulées au LPS pendant 4 ou 12 heures. L'ARN a été extrait et converti en cDNA puis l'expression génique d'IL-10 et d'IL-12 a été déterminée par PCR en temps réel en utilisant la méthode $\Delta\Delta CT$. (A et B) Les résultats sont présentés en terme d'augmentation par rapport à la condition DMSO+LPS. Expression génique de l'IL-10 après 4 et 12 heures de

stimulation au LPS. Les GM/DCs ont aussi été stimulées au LPS pour 24 heures, les surnageants ont été récoltés et la production de cytokines sécrétées a été mesurée par ELISA. La production d'IL-10 après 24 heures de stimulation au LPS a donc été mesurée (C). L'expression génique de l'IL-12p35 a aussi été quantifiée après 4 et 12 heures de stimulation au LPS (D et E). L'expression génique de l'IL-12p40 a été quantifiée après 4 et 12 heures de stimulation au LPS (F et G). La sécrétion d'IL-12p70 a été mesurée après 24 heures de stimulation au LPS chez les GM/DCs pré-incubées avec le DMSO ou le LY294002 et chez les IL-4/DCs pré-incubées avec du DMSO (H). Résultats représentatifs de 4-6 expériences. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD (**p < 0.01, ***p < 0.001 ****p < 0.0001).

7.3.4 Modulation de l'expression de l'IL-23p19 et de la production d'IL-23 lors de l'inhibition de la PI3K.

Nous nous sommes ensuite interrogés sur le rôle potentiel de l'augmentation de l'IL-12p40 lorsque la PI3K est inhibée. L'IL-12p40 peut dimériser avec l'IL-23p19 pour former l'IL-23. Nous avons donc mesuré l'expression génique de l'IL-23p19 dans les mêmes conditions expérimentales que celles mentionnées plus haut. Nous avons remarqué une augmentation importante de l'expression de l'IL-23p19 lorsque la PI3K est inhibée après 4 ou 12 heures de stimulation au LPS (Figure 4A et B). Cette augmentation de l'expression de l'IL-23p19 se traduit par une augmentation de la production de l'IL-23 lorsque les cellules sont pré-incubées avec le LY294002 (Figure 4C).

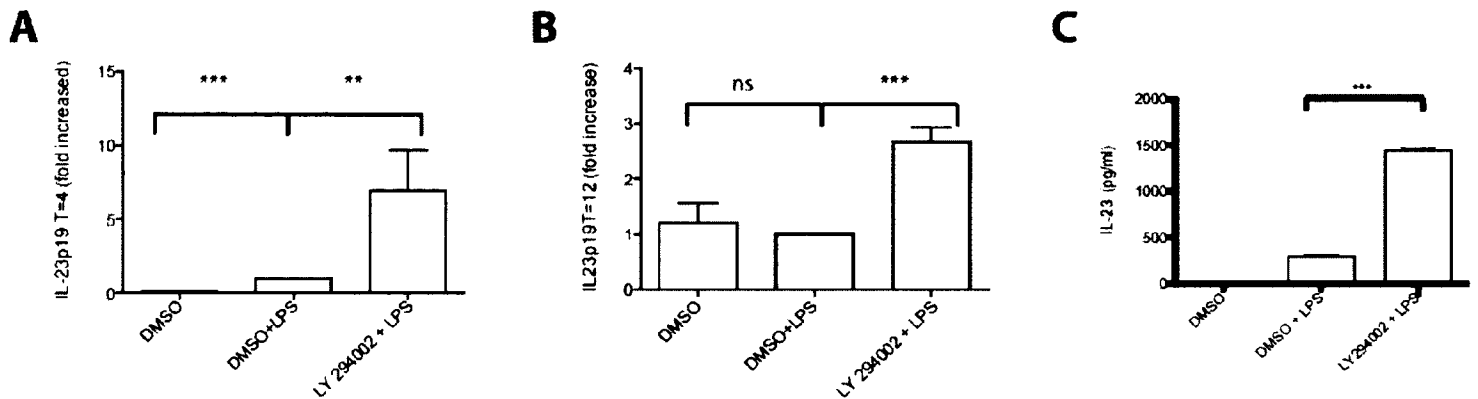


Figure 4. Effet de l'inhibition de PI3K sur l'expression génique de l'IL-23 p19 et la sécrétion de l'IL-23 par les GM/DCs.

Les GM/DCs ont été pré-incubées avec du DMSO ou du LY294002 pendant 1 heure avant d'être stimulées au LPS. L'ARNm a été extrait après 4 heures (A) et 12 heures de stimulation au LPS (B), et une analyse par PCR en temps réel a été effectuée afin de mesurer l'expression de l'IL-23p19 en utilisant la méthode $\Delta\Delta\text{CT}$. Les résultats sont présentés en terme d'augmentation par rapport à la condition DMSO+LPS. La production d'IL-23 par les GM/DCs stimulées au LPS durant 24 heures a été mesurée dans le surnageant par ELISA (C). Résultats représentatifs de 4-6 expériences. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$).

7.3.5 Production de cytokines impliquées dans la conversion de lymphocytes T naïfs en Th17

L'IL-23 est une cytokine impliquée dans la différenciation des lymphocytes Th17. Cependant, la conversion des lymphocytes T naïfs en Th17 requiert aussi la présence d'autres cytokines telles que l'IL-6 et le TGF β . Nous avons donc analysé l'expression de ces deux cytokines lorsque les GM/DCs sont pré-incubées avec le DMSO ou le LY294002. Aucune différence significative n'a été observée dans l'expression du gène de l'IL-6 après 4 ou 12 heures de stimulation au LPS (Figure 5A et B). Nous avons aussi mesuré la production d'IL-6 sécrétée dans le surnageant des DCs. Les résultats ne montrent aucune différence significative dans les quantités d'IL-6 produites par les DCs pré-incubées avec le DMSO ou le LY294002 (Figure 5C). Nous avons aussi analysé l'expression du TGF- β lorsque la PI3K est inhibée. Une augmentation importante de l'expression du TGF- β est observée lorsque la PI3K est inhibée comparativement au contrôle après 4 et 12 heures de stimulation au LPS (Figure 5D et E). Afin de mesurer les niveaux sécrétés de TGF- β par les DCs, nous avons tenté de cultiver les DCs dans des milieux à faible concentration de sérum ou en présence d'agent de remplacement de sérum. Cependant, la morphologie ainsi que les réponses fonctionnelles des DCs ainsi cultivées sont affectées et ne représentent pas les DCs cultivées dans nos conditions expérimentales habituelles. La détection du TGF- β par ELISA nécessite l'activation de ce dernier et comme le sérum que nous utilisons dans le milieu de culture contient une concentration importante de TGF- β , il nous a été impossible de mesurer la quantité de TGF- β produite par les DCs. Une alternative serait l'utilisation d'anticorps neutralisant afin de déterminer l'importance du TGF- β dans les expériences. Néanmoins, les résultats de la figure 5 montrent une augmentation de la sécrétion des cytokines impliquées dans la conversion des T naïfs en Th17.

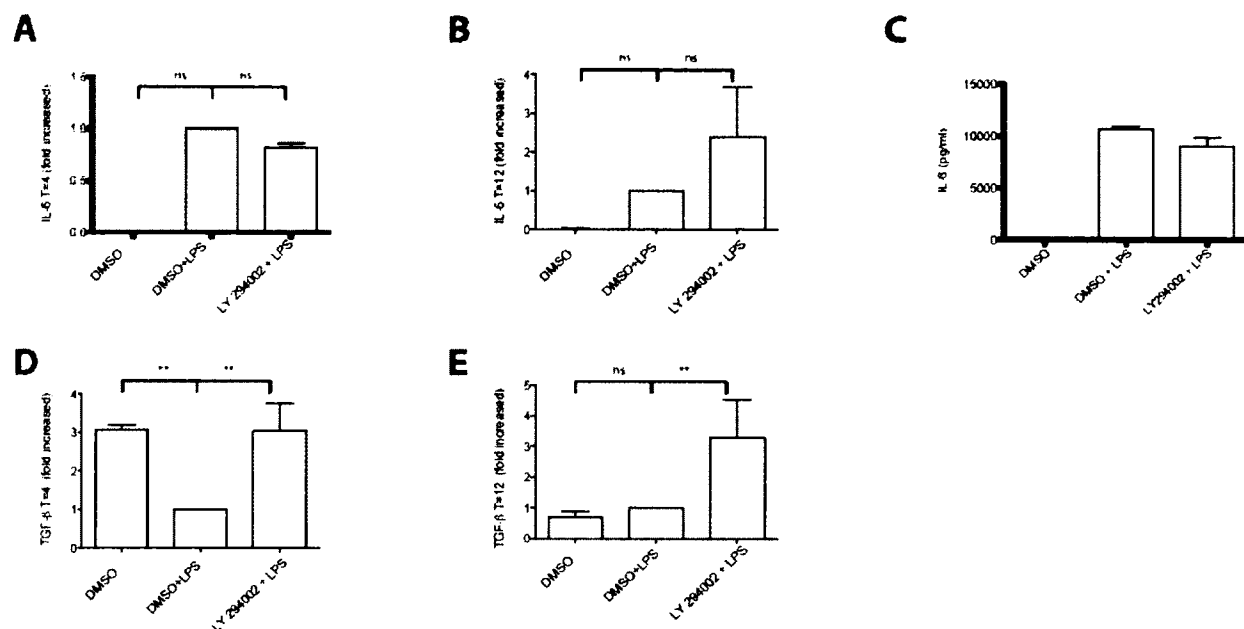


Figure 5. Expression et production d'IL-6 et de TGF-β lors de l'inhibition de la PI3K chez les GM/DCs.

Après 4 heures (A) ou 12 heures (B) de stimulation au LPS, l'ARNm des GM/DCs a été isolé, le cDNA a été généré et l'expression génique de l'IL-6 a été déterminée par PCR en temps réel en utilisant la méthode $\Delta\Delta CT$. Les résultats sont présentés en terme d'augmentation par rapport à la condition DMSO LPS. Les cellules ont aussi été stimulées au LPS pendant 24 heures et le surnageant a été récolté puis l'IL-6 sécrétée a été mesurée par ELISA (C). L'expression de l'ARNm du TGF-β a aussi été déterminée après 4 heures (D) et 12 heures (E) de stimulation au LPS. Résultats représentatifs de 4-6 expériences. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD (**p < 0.01).

7.3.6 Conversion des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th17

Les derniers résultats indiquent que les GM/DCs pré-incubées avec le LY294002 possèdent certaines des caractéristiques nécessaires pour favoriser la conversion de lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th17. Nous avons donc analysé la capacité des GM/DCs à induire la conversion de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en Th17. Pour ce faire, les GM/DCs ont été pré-incubées 1 heure avec le LY294002 ou le DMSO puis stimulées 8 heures au LPS. Par la suite, les GM/DCs ont été cultivées avec des lymphocytes T naïfs CD4⁺ CD25⁻ purifiés de la rate de souris NOD, en présence d'anti-CD3 et d'anti-CD28. Après 4 jours de culture, les surnageants ont été récupérés et du milieu frais contenant de la bréfeldine a été rajoutée pendant les 4 dernières heures de culture. La bréfeldine est un agent chimique qui bloque les voies de sécrétion des protéines ce qui cause une augmentation de leurs niveaux intracellulaires et qui facilite la détection des protéines d'intérêt. Les cellules ont ensuite été récupérées et marquées avec des anticorps spécifiques afin de déterminer le pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ produisant de l'IFN- γ ou de l'IL-17. Plusieurs conditions de culture ont été effectuées lors de cette expérience afin de déterminer si un contact cellulaire, entre les GM/DCs et les lymphocytes T, était requis ou si les cytokines produites par les DCs étaient suffisantes pour induire la conversion des lymphocytes T. Les résultats montrent que dans toutes les conditions étudiées, il y a deux fois plus de Th17 quand les DCs sont pré-incubées avec le LY294002 comparativement aux DCs pré-incubées avec le DMSO (Figure 6A). Ces résultats indiquent également que la co-culture des lymphocytes T CD4⁺ naïfs avec le surnageant seul ne permet pas d'induire la conversion de ces dernières en Th17. Nous avons aussi déterminé la concentration de cytokines produites par les lymphocytes T CD4⁺ lors de la co-culture. Les lymphocytes T naïfs co-cultivés avec des DCs pré-incubées avec du LY294002 ont une production très faible d'IFN- γ comparativement aux lymphocytes T naïfs co-cultivés avec des DCs pré-incubées avec du DMSO (Figure 6B). À l'inverse, les lymphocytes T co-cultivés avec les DCs pré-incubées avec du LY294002 produisent des quantités importantes d'IL-17 comparativement aux lymphocytes T naïfs co-cultivés avec des DCs pré-incubées avec du DMSO (Figure 6C). Ces résultats indiquent donc que l'inhibition de la PI3K permet aux GM/DCs d'induire des Th17.

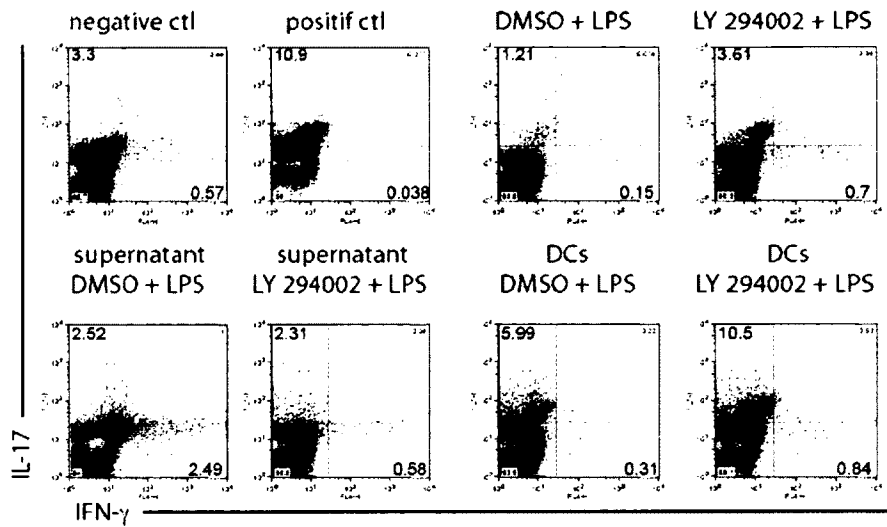
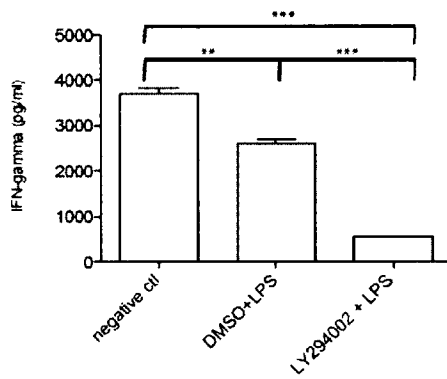
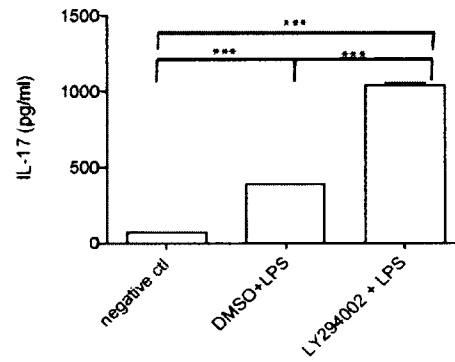
A**B****C**

Figure 6. Effet de l'inhibition de la PI3K chez les GM/DCs sur leur potentiel de conversion des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en Th17.

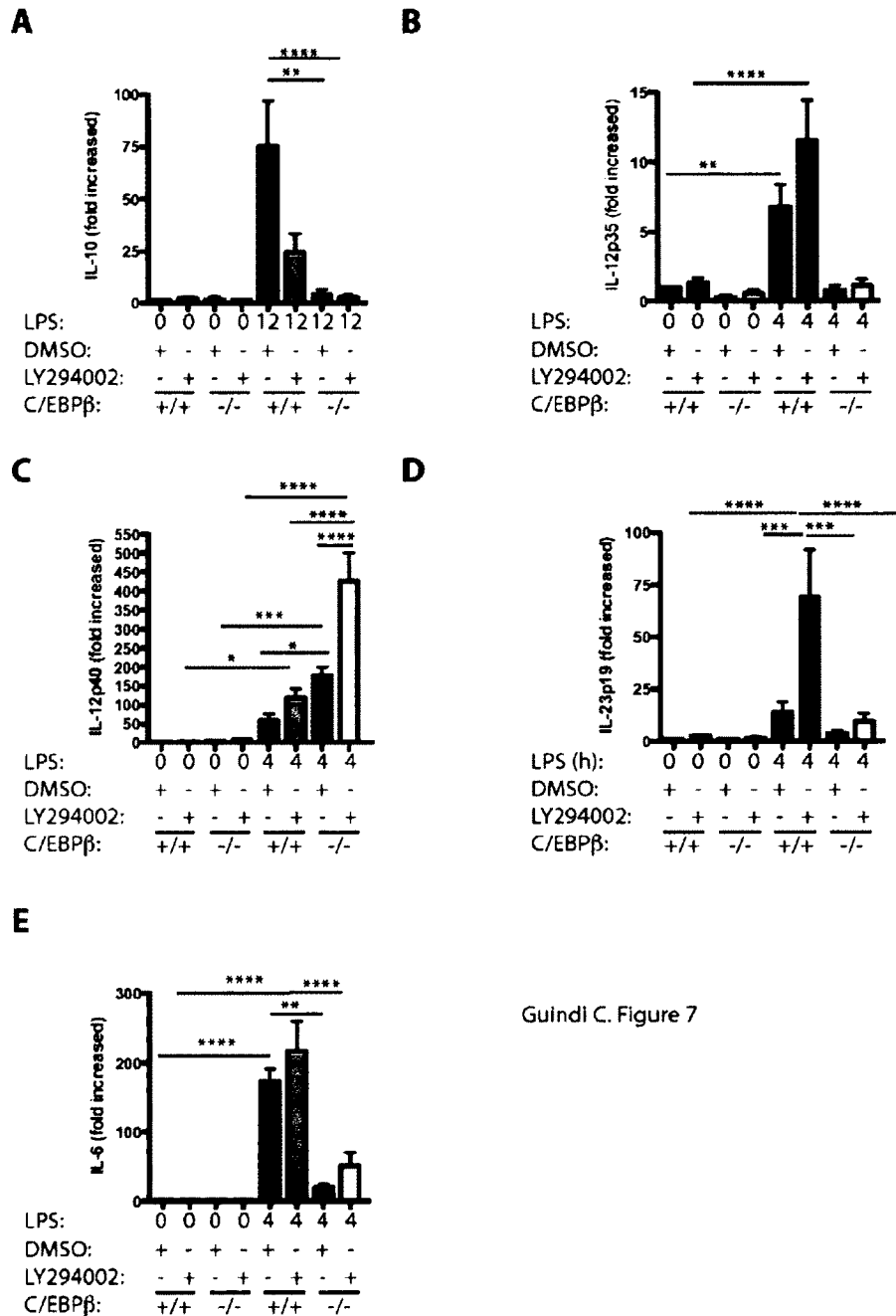
Les GM/DCs ont été pré-incubées avec du DMSO ou du LY294002 pendant une heure puis stimulées au LPS pendant 8 heures. Les cellules ont ensuite été co-cultivées avec des lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ pendant 4 jours. Les surnageants ont ensuite été récoltés et remplacés par du milieu contenant de la bréfedine pendant les dernières 4 heures de co-culture. Les cellules ont été récoltées, marquées avec des anticorps spécifiques et puis analysées par cytométrie de flux. Les conditions (DMSO + LPS et LY294002 + LPS) représentent la co-culture des lymphocytes T CD4⁺ avec les DCs et leurs surnageants. Les conditions « supernatant » représentent la co-culture de lymphocytes T CD4⁺ avec uniquement le surnageant cellulaire de

GM/DCs stimulées au LPS durant 8 heures. Quant à elles, les conditions « DCs » représentent la co-culture de lymphocytes T CD4⁺ avec des GM/DCs stimulées durant 8 heures au LPS mais sans le surnageant. L'analyse présentée ici est représentative de 3 expériences indépendantes (A). Les quantités d'IFN- γ (B) et d'IL-17 (C) produites par les lymphocytes T CD4⁺ dans les surnageants des co-cultures ont été mesurées par ELISA. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD (**p < 0.01, ***p < 0.001).

7.3.7 Implication de C/EBP β dans la production de cytokines menant à la conversion des lymphocytes T CD4 $^{+}$ naïfs en Th17

Puisque l'inhibition de la PI3K induit une forte liaison de C/EBP à l'ADN chez les GM/DCs, nous avons déterminé le rôle de ce facteur de transcription dans la capacité des DCs à convertir les lymphocytes T CD4 $^{+}$ naïfs en Th17. Nous avons déjà démontré que les GM/DCs générées à partir de la moelle osseuse de souris déficientes en C/EBP β ont un phénotype plus mature que les GM/DCs générées à partir de moelle de souris C/EBP $\beta^{+/+}$. Nous avons tout d'abord analysé l'expression génique de l'IL-10 chez les GM/DCs des souris C/EBP $\beta^{-/-}$ et des souris C/EBP $\beta^{+/+}$ après stimulation au LPS. Les résultats montrent une forte augmentation de l'expression du gène de l'IL-10 chez les GM/DCs de souris C/EBP $\beta^{+/+}$ pré-incubées avec le véhicule (DMSO). Cependant, aucune augmentation de l'expression du gène d'IL-10 n'est observée en présence du LY294002 (Figure 7A). L'analyse de l'expression du gène de l'IL-10 chez les GM/DCs de souris C/EBP $\beta^{-/-}$ montre une diminution drastique de l'expression de l'ARNm de l'IL-10, et ce, que la PI3K soit inhibée ou non. Nous avons aussi déterminé l'expression génique de l'IL-12p35 après 4 heures de stimulation au LPS. Les résultats présentés à la Figure 7B montrent une forte induction de l'ARNm de l'IL-12p35 chez les GM/DCs des souris C/EBP $\beta^{+/+}$. Cette induction est beaucoup plus importante lorsque les cellules sont pré-incubées avec l'inhibiteur de la PI3K. Chez les GM/DCs de souris C/EBP $\beta^{-/-}$, on n'observe pas d'augmentation de l'expression du gène de l'IL12p35, que les cellules soient pré-incubées avec du LY294002 ou du DMSO. L'analyse de l'expression du gène de l'IL-12p40 a aussi révélé une induction importante de l'IL-12p40 lorsque les GM/DCs sont pré-incubées avec du LY294002 comparativement au véhicule (Figure 7C). Ces résultats sont similaires à ceux présentés dans les sections précédentes avec les GM/DCs de souris NOD. De façon intéressante, les GM/DCs de souris C/EBP $\beta^{-/-}$ montrent une augmentation beaucoup plus prononcée de l'expression de l'IL-12p40 lorsque les cellules sont pré-incubées avec le LY294002. Cette augmentation est beaucoup plus importante que celle observée avec les cellules des souris C/EBP $\beta^{+/+}$. Chez les GM/DCs de souris NOD, nous avons démontré que l'augmentation de l'expression de IL-12p40 est accompagnée d'une augmentation de l'expression de l'IL-23p19 (Figure 3 et 4). Nous avons donc analysé l'expression de l'IL-23p19 chez les GM/DCs de souris C/EBP $\beta^{-/-}$ et C/EBP $\beta^{+/+}$. Les résultats (Figure 7D) montrent une augmentation

importante de l'expression de l'ARNm de l'IL-23p19 chez les GM/DCs de souris $C/EBP\beta^{+/+}$ lorsque la PI3K est inhibée. Cependant, cette augmentation n'est pas observée chez les GM/DCs de souris $C/EBP\beta^{-/-}$. Ces résultats suggèrent que $C/EBP\beta$ est impliqué dans l'induction de IL-23p19. Nous nous sommes ensuite intéressés au niveau d'ARNm d'IL-6 puisque cette cytokine est aussi importante pour la conversion des lymphocytes T $CD4^{+}$ naïfs en Th17. Les résultats obtenus montrent une baisse importante de la production de cette cytokine chez les GM/DCs de souris $C/EBP\beta^{-/-}$, que la PI3K soit inhibée ou non (Figure 7E). Ces résultats montrent que le facteur de transcription $C/EBP\beta$ régule l'expression de plusieurs cytokines, telles que l'IL-23 et l'IL-6, impliquées dans la conversion des lymphocytes T naïfs en Th17.



Guindi C. Figure 7

Figure 7. Rôle de la PI3K et de C/EBPβ dans la régulation de l'expression génique de cytokines chez les GM/DCs

Les GM/DCs ont été générées pendant 7 jours à partir de moelle osseuse de souris C/EBPβ^{-/-} et de souris C/EBPβ^{+/+} et pré-incubées 1 heure avec du DMSO ou du LY294002 (10 μM). Les cellules ont ensuite été stimulées au LPS pendant 4 ou 12 heures et l'ARNm a été extrait. Les analyses

par PCR en temps réel ont ensuite été réalisées afin de déterminer l'expression génique de l'IL-10 (A), de l'IL-12p35 (B), de l'IL-12p40 (C), de l'IL-23p19 (D) ainsi que de l'IL-6 (E). Les résultats sont présentés en terme d'augmentation par rapport à la condition DMSO. Résultats représentatifs de 4-6 expériences. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001****p < 0.0001).

7.3.8 Effet de l'inhibition de la PI3K sur la production de cytokines par les GM/DCs de souris C/EBP β ^{-/-} ou C/EBP β ^{+/+}.

Par la suite, nous avons analysé par ELISA la production de ces différentes cytokines par les DCs. Chez les GM/DCs de souris C/EBP β ^{-/-}, on observe une baisse de la production d'IL-10 après 24 heures de stimulation au LPS en comparaison aux cellules de souris C/EBP β ^{+/+}. Lorsque la PI3K est inhibée, une diminution importante est observée dans les deux types de souris (Figure 8A). Après 48 heures de stimulation au LPS, la production d'IL-10 est similaire entre les GM/DCs des souris C/EBP β ^{-/-} et C/EBP β ^{+/+} (Figure 8B). Lorsque la PI3K est inhibée, on observe toujours une diminution importante de la production de l'IL-10 par les GM/DCs des souris C/EBP β ^{+/+} et C/EBP β ^{-/-} après 48 heures de stimulation au LPS. Cependant, la diminution de production d'IL-10 chez les GM/DCs des souris C/EBP β ^{-/-} est moins importante que celle observée chez les souris C/EBP β ^{+/+}.

Par la suite, nous avons mesuré la production d'IL-12p70 lorsque la PI3K est inhibée ou non chez les GM/DCs des deux types de souris. Les résultats montrent une augmentation de la production d'IL-12p70 chez les GM/DCs de souris C/EBP β ^{+/+} comparativement à celles de souris C/EBP β ^{-/-} lorsque les GM/DCs sont pré-incubées avec le DMSO (Figure 8C). L'inhibition de la PI3K cause uniquement une augmentation de la quantité d'IL-12p70 produite chez les GM/DCs de souris C/EBP β ^{+/+} (Figure 8C).

Comme l'expression génique de l'IL-23p19 est fortement augmentée chez les souris C/EBP β ^{+/+} lorsque la PI3K est inhibée, nous avons déterminé les quantités d'IL-23 produites par les GM/DCs des souris déficientes en C/EBP β et des souris C/EBP β ^{+/+}. Les résultats obtenus montrent une production importante d'IL-23 par les GM/DCs de souris C/EBP β ^{+/+} lorsque la PI3K est inhibée (Figure 8D). Cette augmentation d'IL-23 n'est pas observée chez les GM/DCs des souris C/EBP β ^{-/-}, ce qui suggère l'implication de C/EBP β dans cette réponse.

Nous avons aussi analysé les concentrations d'IL-6 et d'IL-12p40 produites par les GM/DCs de souris C/EBP β ^{-/-} et C/EBP β ^{+/+} lorsque la PI3K est inhibée ou non. Nous avons observé une

diminution importante de la production d'IL-6 chez les GM/DCs de souris C/EBP β ^{-/-} (Figure 8E). Nos résultats montrent également que l'inhibition de la PI3K n'affecte pas la production d'IL-6 produite par les GM/DCs des souris C/EBP β ^{+/+}. Nous avons ensuite évalué la production d'IL-12p40 par les GM/DCs. Les résultats présentés en Figure 8F montrent que l'inhibition de la PI3K chez les GM/DCs de souris C/EBP β ^{+/+} n'affecte pas la production d'IL-12p40. Par contre, on a remarqué une augmentation importante de la production d'IL-12p40 chez les souris C/EBP β ^{-/-} comparativement aux souris C/EBP β ^{+/+}, et ce, que la PI3K soit inhibée ou non. Ces résultats montrent encore une fois que l'inhibition de la PI3K n'affecte pas la production d'IL-12p40 chez les souris C/EBP β ^{-/-}.

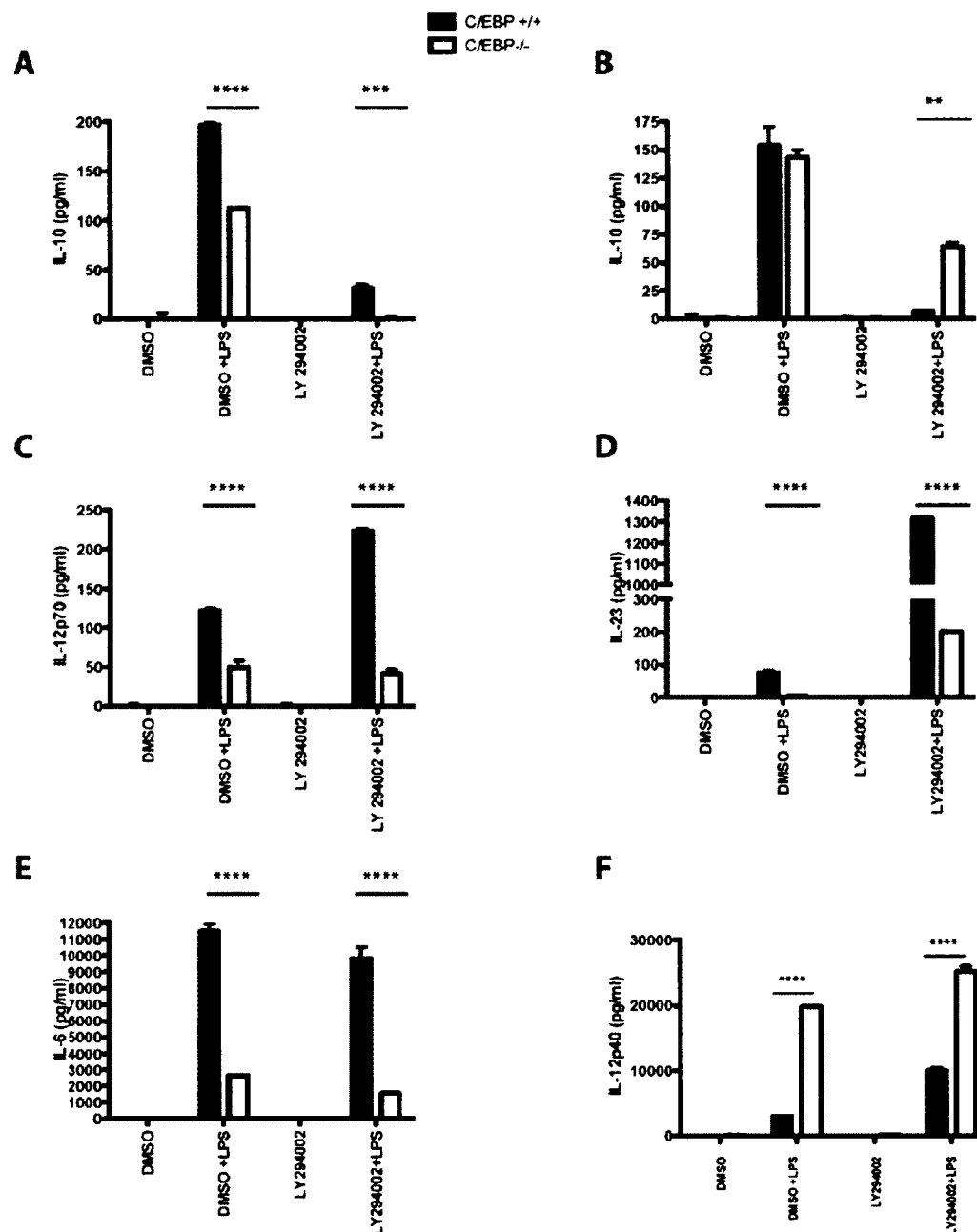


Figure 8. Implication de la PI3K dans la production de cytokines régulées par C/EBP β .

Les GM/DCs ont été générées à partir de souris C/EBP $\beta^{-/-}$ ou C/EBP $\beta^{+/+}$ pendant 7 jours et ont été pré-incubées 1 heure avec le DMSO ou le LY294002. Ensuite, les cellules ont été stimulées au LPS (1 μ g/ml) pendant 24 ou 48 heures, les surnageants ont été récupérés et la production d'IL-10 (A et B), d'IL-12p70 (C), d'IL-23 (D), d'IL-6 (E) et d'IL-12p40 (F) a été quantifiée par

ELISA. Résultats représentatifs de 4-6 expériences. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001****p < 0.0001).

7.3.9 Conversion des lymphocytes T naïfs en Th17.

Nous nous sommes intéressés à la capacité des DCs à convertir les lymphocytes T naïfs en Th17. Pour ce faire, les GM/DCs des souris C/EBP β ^{-/-} ou ^{+/+} ont été pré-incubées avec du DMSO ou le LY294002, puis stimulées au LPS pendant 8 heures. Par la suite, les GM/DCs ont été co-cultivées avec les lymphocytes T CD4⁺ de souris C/EBP β ^{+/+} pendant 4 jours. À terme, les cellules ont été fixées, marquées à l'aide d'anticorps spécifiques puis analysées par cytométrie de flux. Les résultats montrent une augmentation du pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ produisant de l'IL-17 lorsque ceux-ci sont co-cultivés avec les GM/DCs de souris C/EBP β ^{+/+} pré-incubées avec le LY294002 comparativement aux lymphocytes T CD4⁺ co-cultivés avec les GM/DCs de souris C/EBP β ^{+/+} pré-incubées avec le DMSO (Figure 9). Lorsque les lymphocytes T CD4⁺ sont co-cultivés avec les GM/DCs de souris C/EBP β ^{-/-}, on observe une forte augmentation du nombre de lymphocytes Th17, que les GM/DCs soient pré-incubées ou non avec le LY294002 (Figure 9). Ceci démontre l'implication de C/EBP β dans la capacité des GM/DCs à induire la conversion de T naïfs en Th17.

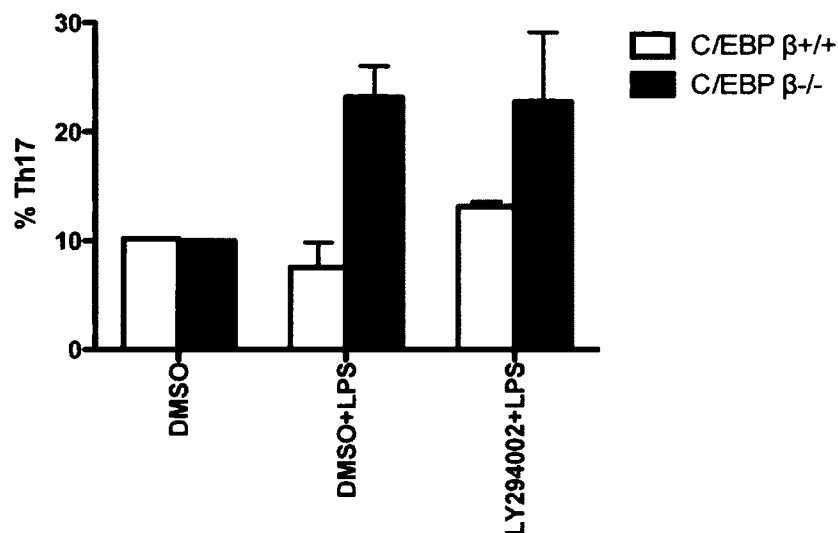


Figure 9. Conversion des lymphocytes T CD4⁺ par les GM/DCs de souris C/EBP $\beta^{+/+}$ et de souris C/EBP $\beta^{-/-}$.

Les GM/DCs de souris C/EBP $\beta^{+/+}$ et de souris C/EBP $\beta^{-/-}$ ont été pré-incubées 1 heure avec du LY294002 ou du DMSO puis stimulées 8 heures au LPS. Les cellules ont ensuite été co-cultivées avec des lymphocytes T CD4⁺ de souris C/EBP $\beta^{+/+}$ pendant 4 jours, récupérées et le nombre de cellules Th17 a été déterminé par cytométrie de flux. Les résultats représentent la compilation de deux expériences indépendantes. Résultats représentatifs de 2 expériences. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD.

8 Discussion

Les quatre chapitres de cette thèse permettent de mieux comprendre les mécanismes par lesquels le GM-CSF permet d'induire une population de DCs tolérogènes qui protège contre le diabète de type 1. Selon les statistiques les plus récentes, environ 30 millions de personnes à l'échelle mondiale sont affectées par le diabète de type I. De plus, plusieurs centaines de milliers de nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. La progression de cette maladie touchant principalement les enfants et les adolescents est constante et préoccupante. Il est important de développer des traitements curatifs et/ou préventifs afin d'empêcher le développement de la maladie chez les gens à risque. Pour atteindre ces objectifs, il est primordial de comprendre les mécanismes permettant de contrôler ou même d'enrayer cette pathologie. En utilisant le modèle murin de diabète de type 1, nous avons montré que le traitement au GM-CSF empêche le développement du diabète. De plus, ce traitement pourrait être envisageable chez un patient diabétique qui reçoit une greffe d'îlots puisque la prise d'immunosuppresseurs n'empêche pas le rejet des greffons (Vendrame *et al.*, 2010). En induisant une tolérance contre les antigènes du soi, il est possible que le patient ne rejette pas le greffon. Il est aussi important de mentionner que d'autres traitements, comme l'injection de G-CSF (Kared *et al.*, 2005) ou de TSLP (Besin *et al.*, 2008), peuvent aussi permettre d'induire une tolérance aux antigènes du soi. La génération de DCs tolérogènes pourrait aussi mener à une thérapie cellulaire contre le diabète de type 1. Chez l'homme, il serait donc possible de générer des DCs tolérogènes *in vitro* à partir de sang périphérique du patient et de les lui réinjecter pour assurer la tolérance au départ puis maintenir cette population. Pour atteindre cet objectif, il faut bien comprendre les mécanismes par lesquels les DCs induisent la tolérance et les mécanismes qui régulent leurs fonctions tolérogènes.

Dans une étude antérieure, nous avons démontré que le GM-CSF affecte directement les cellules souches de la moelle osseuse et non les DCs différenciées (Gaudreau *et al.*, 2010). En générant des IL-4/DCs *in vitro* à partir de la moelle de souris NOD traitées au GM-CSF, nous avons démontré que le traitement au GM-CSF reprogramme les cellules souches hématopoïétiques pour les différencier en DCs tolérogènes. Normalement, les IL-4/DCs des souris NOD ont un phénotype mature, et produisent des cytokines pro-inflammatoires. Lorsque les IL-4/DCs sont générées *in vitro* à partir de souris traitées au GM-CSF, elles deviennent matures, mais elles

expriment plus de molécules PD-L1 à leur surface. La molécule PD-L1 est impliquée dans la tolérance immunitaire (Latchman *et al.*, 2004), car elle permet de diminuer l'activation des lymphocytes T et induit la différenciation des T regs (Francisco *et al.*, 2010). L'augmentation de l'expression de cette protéine observée chez les DCs générées à partir de la moelle osseuse de souris traitées peut donc être responsable de la protection médiée par ces dernières.

Il existe plusieurs façons de générer des DCs à partir de la moelle osseuse de souris. Plusieurs doses de GM-CSF ont été utilisées, plusieurs durées de différenciation et plusieurs sources de GM-CSF ont aussi été utilisées. Cela donne lieu à des différences entre les résultats publiés dans la littérature. Par exemple, le groupe de Feili-Hariri et Morel, a montré que les IL-4/DCs de souris NOD protègent contre le diabète de type 1 (Feili-Hariri *et al.*, 2003), et induisent une production plus importante d'IL-10 de la part des cellules immunitaires (Feili-Hariri *et al.*, 1999). Contrairement à ce groupe, notre groupe et celui de Lutz, ont montré que les GM/DCs de souris NOD sont moins matures et qu'elles produisent plus de cytokines anti-inflammatoires alors que les IL-4/DCs induisent une réponse immunitaire importante et produisent des cytokines pro-inflammatoires (Lutz *et al.*, 2000). Ces différences peuvent être attribuables au fait que les groupes de Morel et Feili-Hariri génèrent leurs DCs durant 10 jours *in vitro* tandis que nous les générons pendant 7 jours alors que d'autres groupes les génèrent uniquement pendant 5 jours. De plus, nous utilisons du GM-CSF recombinant dont la concentration est bien déterminée. D'autres groupes de recherche utilisent le surnageant des cellules J558L transduites avec le gène du GM-CSF afin de supplémenter le milieu de culture de DCs *in vitro* (Wang *et al.*, 2007b). Cependant, la confluence des cellules J558L influence la concentration de GM-CSF que l'on retrouve dans le surnageant, ce qui a un impact direct sur la concentration de GM-CSF dans le milieu de différenciation des DCs. Le groupe de Lutz (Lutz *et al.*, 2000) a démontré que la concentration de GM-CSF avait un impact important sur l'état de maturation et sur les fonctions des DCs. Il est donc important de prendre en compte tous ces facteurs lorsqu'on compare les différents résultats dans la littérature sur la génération des DCs.

Avant les travaux réalisés dans cette thèse, il avait été rapporté que chez les DCs de souris NOD, il y a une activation importante de NF- κ B (Poligone *et al.*, 2002) et que cette forte activation est responsable de leur maturation plus importante (Ma *et al.*, 2003; Weaver *et al.*, 2001). Dans le

deuxième chapitre, nous avons effectivement observé une forte activation de NF- κ B dans les GM/DCs de souris NOD en réponse au LPS, et nous avons aussi démontré un recrutement préférentiel de NF- κ B au promoteur de l'IL-10 et non à celui de l'IL-12p35, comparativement aux IL-4/DCs. En somme, nous avons montré que le facteur NF- κ B (notamment la sous-unité p65) participe à la transactivation du promoteur de l'IL-10 et qu'il est impliqué dans l'induction de l'expression de ce gène. À l'opposé, aucune expression d'IL-12p35 (ou très peu) n'est observée chez les GM/DCs. Le facteur NF- κ B (p65/p52) ne régule donc pas l'expression de l'IL-12p35 chez ces mêmes cellules. Le recrutement de NF- κ B au promoteur de l'IL-10 nous permet de conclure que NF- κ B est non seulement important pour la maturation, mais aussi pour la régulation de la production de cytokines.

En ce qui concerne l'implication du facteur de transcription NF- κ B dans la maturation des cellules dendritiques, il a été démontré que l'inhibition de RelB grâce à l'utilisation de siRNA empêchait la maturation des DCs, ce qui permettait de protéger contre le rejet de greffe cardiaque chez la souris (Li *et al.*, 2007). De plus, les souris déficientes en RelB ont moins de DCs que les souris normales (de type sauvage) (Burkly *et al.*, 1995). Ces études démontrent le rôle important de RelB non seulement dans la génération, mais aussi dans les fonctions des DCs. Dans cette thèse, nous avons également montré que RelB ne lie pas l'ADN dans les GM/DCs et que ces cellules résistent à la maturation. Nos résultats indiquent donc que l'inaptitude de RelB à lier l'ADN chez les GM/DCs contribue à leur phénotype tolérogénique. De plus, nous avons démontré cette caractéristique particulière des tDCs chez plusieurs souches de souris (NOD et BALB/c). Ces observations sont donc en accord avec un rôle important de RelB dans le contrôle de la maturation des DCs.

Dans la même étude, nous avons aussi démontré que le facteur de transcription AP-1 était aussi très important pour la production de cytokines par les GM/DCs et que la liaison d'AP-1 à l'ADN était médiée par les MAP kinases ERK1/2. Plusieurs groupes ont montré que les kinases ERK1/2 sont impliquées dans la production d'IL-10 chez les DCs (Agrawal *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 1999). Cependant, aucune étude n'a montré une activation soutenue de ERK1/2 après une longue stimulation au LPS comme nous l'avons démontré. Une étude fait état d'un équilibre entre la phosphorylation de p38 et de ERK et la régulation de la production d'IL-12 et d'IL-10

(Mathur *et al.*, 2004). Plusieurs études ont montré que p38 est impliquée dans la production d'IL-12p70 alors que les kinases ERK1/2 sont impliquées dans la production d'IL-10 chez les DCs (Dillon *et al.*, 2004; Puig-Kroger *et al.*, 2001). Bien que ces travaux suggèrent une activation soit de p38 ou de ERK1/2 chez les DCs, nous avons démontré que chez les GM/DCs il y a une activation de ERK1/2 et de p38 suite à une stimulation au LPS, et que ces deux voies de signalisation sont impliquées dans la production d'IL-10. En effet, les résultats présentés dans cette thèse montrent que l'inhibition de ERK1/2 diminue la production d'IL-10 de 50 % chez les GM/DCs et que le facteur de transcription AP-1 serait un effecteur principal de la voie de signalisation ERK1/2. Nos résultats ont également démontré que l'inhibition de p38 n'entraîne pas une augmentation de l'expression des molécules de costimulation mais qu'elle diminue fortement la production d'IL-10 chez les GM/DCs. D'autres études ont montré que p38 est plutôt impliquée dans la production de l'IL-12 ainsi que dans la maturation des DCs (Arrighi *et al.*, 2001; Mathur *et al.*, 2004). Chez les GM/DCs de souris NOD, lorsque p38 est inhibée, on remarque une forte augmentation de la production d'IL-12p70, ce qui démontre que p38 régule négativement la production d'IL-12p70 tout comme l'inhibition de ERK1/2 le fait. Ainsi, contrairement à certaines publications de la littérature qui proposent qu'il existe un équilibre dans l'activation des voies ERK1/2 et p38 et leur implication dans la régulation de production d'IL-12p70, nos résultats montrent plutôt une synergie entre les deux voies de signalisation. De plus, nous avons observé chez les tDCs qu'il y a une activation simultanée de ces deux voies de signalisation et non une activation préférentielle de l'une ou l'autre de ces MAP kinases. Nous démontrons que ces deux voies de signalisation sont impliquées dans la génération du phénotype de ces cellules et dans leurs réponses fonctionnelles. Finalement, un résumé des résultats obtenus dans le chapitre 2 est présenté dans la figure 1.

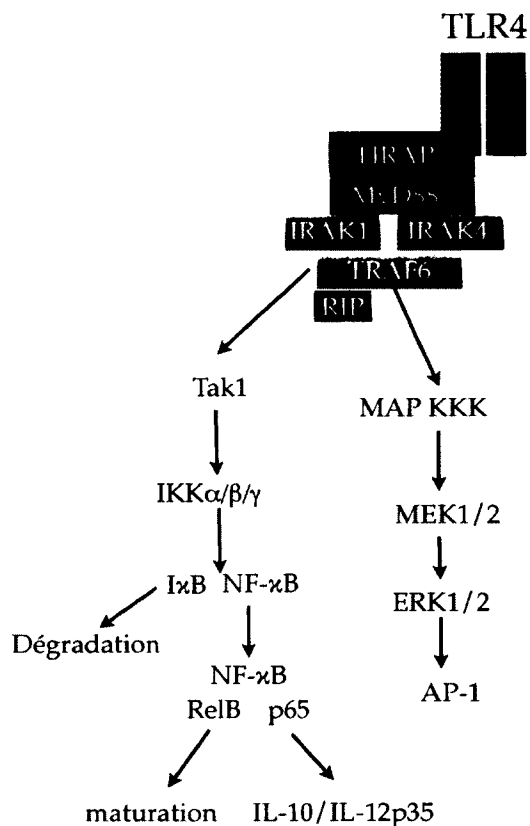


Figure 1. Résumé schématique des résultats présentés dans le chapitre 2

Nous avons démontré que NF- κ B lie l'ADN chez les GM/DCs et que ce complexe est constitué de p52/p65. RelB étant impliqué dans l'expression des molécules de costimulation, mais absent du complexe liant l'ADN chez les GM/DCs, nous croyons que cela explique en partie l'inhibition de la maturation observée chez les GM/DCs. Nous avons aussi démontré un recrutement préférentiel de p65 au promoteur de l'IL-10. De plus, nous avons démontré que la voie MEK1/2-ERK1/2-AP-1 est importante pour la production d'IL-10 par les GM/DCs.

Concernant le phénotype des cellules dendritiques, il a été démontré que l'IL-10 produite par les DCs peut moduler leur état de maturation par un mécanisme autocrine. En effet, une étude a montré que l'IL-10 produite par les DCs est responsable de l'inhibition de la maturation des DCs (Corinti *et al.*, 2001). Chez les GM/DCs nos résultats montrent que l'inhibition de ERK1/2 diminue la production d'IL-10 de 50%, mais qu'elle n'affecte en rien leur maturation. De plus, les GM/DCs générées à partir de la moelle osseuse de souris déficientes en IL-10 (NOD.IL-10^{-/-}) ont le même phénotype que les DCs générées à partir de souris de type sauvage (NOD.IL-10^{+/+}) (Corinti *et al.*, 2001). À l'opposé, lorsque les IL-4/DCs sont générées en présence d'IL-10, on remarque une importante diminution de l'expression des molécules de costimulation. Ces résultats montrent que l'IL-10 inhibe la maturation des IL-4/DCs, mais pas celle des GM/DCs. La production élevée d'IL-10 par les GM/DCs n'est donc pas responsable de leur résistance à la maturation, ce qui suggère que d'autres mécanismes soient impliqués dans cette résistance à la maturation. (Arrighi *et al.*, 2001; Mathur *et al.*, 2004)

Dans le chapitre 3, nous avons examiné le rôle du facteur de transcription C/EBP β dans la régulation fonctionnelle des cellules dendritiques. Ce facteur de transcription était déjà connu pour son implication dans la régulation de plusieurs gènes dont notamment plusieurs encodant des cytokines et chimiokines chez diverses populations de cellules immunitaires telles que les monocytes, les macrophages et les neutrophiles (Cloutier *et al.*, 2009; Ramji et Foka, 2002). Nous avons démontré pour la première fois que C/EBP β est impliqué dans la production de cytokines et dans la régulation de l'expression des molécules de costimulation chez les DCs. Les découvertes principales de cette section sont illustrées dans la figure 2.

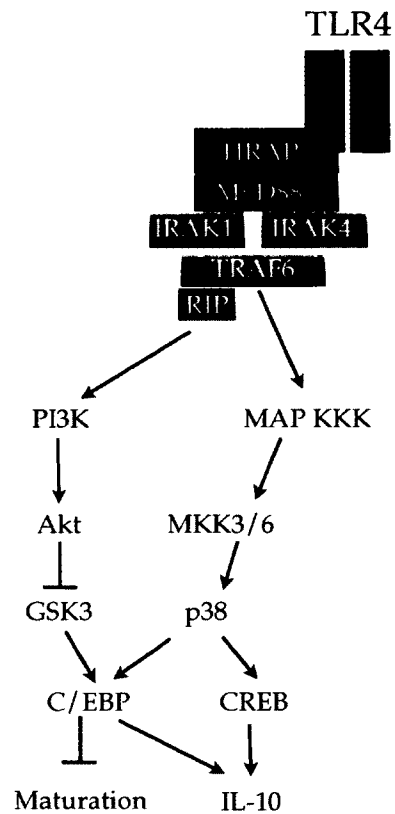


Figure 2. Représentation schématique des résultats obtenus dans le chapitre 3.

Nous avons démontré que C/EBP β est impliquée dans la production précoce de l'IL-10 et dans la résistance à la maturation des GM/DCs. Nos résultats suggèrent aussi que le facteur de transcription CREB pourrait participer à la production tardive d'IL-10 par les DCs toléro-gènes.

De façon intéressante, nous avons montré que C/EBP β est activé uniquement chez les DCs tolérogènes et non chez les DCs immunogènes. En effet, C/EBP β lie l'ADN seulement chez les DCs tolérogènes (GM/DCs). Nos résultats indiquent également que cette caractéristique n'est pas exclusive aux GM/DCs de souris NOD puisque nous avons observé un patron d'activation de C/EBP β semblable chez les GM/DCs de souris BALB/c. Comme le C/EBP β peut être soit un inducteur ou un répresseur de l'expression de gènes (Ramji et Foka, 2002), il est important d'investiguer et de connaître les mécanismes moléculaires qui régulent son expression et son activation chez les tDCs. Nous avons démontré que p38 est une molécule clé dans la régulation de l'expression et de la synthèse de C/EBP β et par le fait même, dans sa liaison à l'ADN dans les DCs. De plus, nous avons démontré que C/EBP β est impliqué dans la régulation de l'expression des molécules de costimulation. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant les kinases p38 et GSK-3 ainsi que l'utilisation de souris déficientes en C/EBP β nous a permis de déterminer que C/EBP β est un répresseur de l'expression des molécules de costimulation chez les tDCs. Le fait que p38 et peut-être CREB contribuent à inhiber l'expression des molécules de costimulation chez les tDCs est surprenant étant donné l'implication de CREB dans la régulation de l'expression de ces molécules chez les DCs immunogènes. En effet, une étude a montré l'importance de CREB dans l'expression des molécules de costimulation chez les DCs immunogènes humaines (Ardeshtna *et al.*, 2000). Chez les DCs tolérogènes (GM/DCs), nos résultats indiquent plutôt que CREB semble être impliqué dans la production d'IL-10 et dans la synthèse du C/EBP β . Il semble donc que CREB module différenciellement les réponses fonctionnelles des divers types de DCs.

En plus des gènes que nous avons étudiés, d'autres sont susceptibles d'être sous le contrôle de C/EBP β chez les tDCs. Un candidat potentiel impliqué dans le contrôle de la tolérance est le gène de CD200, qui comporte un site de liaison C/EBP dans son promoteur (Chen *et al.*, 2006b). Ce gène encode une glycoprotéine membranaire qui fait partie de la superfamille des immunoglobulines. Il a été démontré que la liaison CD200/CD200R induit une signalisation inhibitrice chez les lymphocytes T et induit la conversion des lymphocytes T naïfs en Tregs. Selon nos résultats d'analyse de liaison C/EBP β à l'ADN, nous envisageons que l'expression de CD200 soit augmentée chez les GM/DCs comparativement aux IL-4/DCs. Des expériences ont été réalisées au laboratoire, mais aucun résultat concluant n'a été obtenu. Des problèmes

techniques de non-spécificité ont été rencontrés avec le seul anticorps commercialement disponible. Il faudra attendre la disponibilité commerciale d'autres anticorps dirigés contre le CD200 afin de refaire ces expériences. Si une différence d'expression de CD200 est observée, elle pourrait expliquer la capacité des GM/DCs à convertir les T naïfs en Tregs. Certaines études ont montré l'importance de CD200 dans le maintien de la tolérance au soi (Holmannova *et al.*, 2012; Yu et Gorczynski, 2012). Dans le cas du diabète de type 1, on peut penser qu'une diminution de l'expression de cette molécule à la surface des DCs pourrait contribuer à l'activation des lymphocytes T auto-réactifs.

Afin d'induire la transcription des gènes cibles, C/EBP β doit recruter une histone acétyltransférase (HAT) telle CBP et p300 (Shi *et al.*, 2012). Ces HATs sont recrutées par plusieurs facteurs de transcription tels que CREB et p65 (NF- κ B) (Imamura *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007a). Une compétition peut donc avoir lieu entre ces différents facteurs de transcription pour ces cofacteurs transcriptionnels. Il serait donc intéressant de vérifier l'expression de CBP et p300 chez les GM/DCs et les IL-4/DCs. De plus, des essais de co-immunoprécipitation permettraient de savoir quels facteurs recrutent CBP ou p300. Un recrutement des HAT par NF- κ B peut résulter en une expression importante des gènes sous le contrôle de ce facteur de transcription tandis que le recrutement des HAT par CREB peut résulter en une expression de gènes complètement différents. Il est donc important de déterminer quels facteurs recrutent les HAT afin d'induire l'expression de ces gènes cibles. Dans cette optique, tel que mentionné précédemment, nous avons démontré que la sous-unité p65 de NF- κ B était recrutée préférentiellement au promoteur de l'IL-10 chez les GM/DCs et à celui du gène de l'IL-12p35 chez les IL-4/DCs. Une analyse détaillée de l'état de la chromatine permettrait de mieux comprendre ces phénomènes (par exemple, l'état d'acétylation des histones entourant le promoteur pourrait être évalué). Par exemple, nous avons observé une faible liaison constitutive de la sous-unité p65 de NF- κ B sur le promoteur du gène de l'IL-12p35 chez les GM/DCs non stimulées. Cette liaison n'est plus détectable lorsque ces cellules sont stimulées au LPS. Il semble donc qu'il y ait des changements conformationnels dans la chromatine ce qui module l'affinité de certains facteurs de transcription à lier les promoteurs géniques. Ces modifications sont vraisemblablement effectuées par des HAT ou des HDACs recrutées par des facteurs de transcription.

Dans le cadre de notre étude évaluant le rôle du facteur de transcription C/EBP β dans la régulation fonctionnelle des cellules dendritiques, nos résultats les plus probants et convaincants ont été obtenus grâce à l'utilisation de souris déficientes en C/EBP β . Des souris déficientes en C/EBP β ont été générées simultanément par trois groupes de recherche différents. Tout d'abord, le groupe de Poli a caractérisé les souris déficientes en C/EBP β et a démontré que ces souris souffraient d'une maladie similaire à celle développée par les souris qui surexpriment de l'IL-6 (Screpanti *et al.*, 1995). Aussi, les souris C/EBP $\beta^{-/-}$ âgées développent des lésions cutanées, des splénomégalias et des lymphoadénopathies (Screpanti *et al.*, 1995). De plus, les niveaux d'IL-6 circulants sont très élevés chez les souris C/EBP $\beta^{-/-}$ comparativement aux souris de type sauvage. Nous avons observé une diminution de la production d'IL-6 chez les GM/DCs de souris C/EBP $\beta^{-/-}$. Cette différence peut être expliquée par le fait que C/EBP δ serait aussi impliqué dans la production d'IL-6 (Yan *et al.*, 2012). Dans les GM/DCs, nous avons démontré que seulement C/EBP β est capable de lier l'ADN lorsque celles-ci sont stimulées avec du LPS, tandis que chez les macrophages, C/EBP β et δ lient l'ADN. L'étude du groupe de Poli a aussi permis de démontrer que les macrophages de souris déficientes en C/EBP β ont une production défectueuse d'oxyde nitrique, ce qui les rend plus susceptibles aux infections microbiennes telles les infections à *Candida albicans*. Une autre étude a aussi montré que les macrophages de souris déficientes en C/EBP β ont des problèmes fonctionnels (Tanaka *et al.*, 1995). Cette étude montre qu'un grand nombre de pathogènes peuvent « s'évader » des phagosomes et ainsi échapper à la dégradation. Les auteurs de cette étude ont montré que les souris C/EBP $\beta^{-/-}$ sont hautement susceptibles aux infections causées par *Listeria* et *Salmonella* et que leurs macrophages ont une capacité anti-tumorale réduite. Ces études ont permis de déterminer l'importance de C/EBP β dans les fonctions des macrophages, mais pas chez les DCs. Les auteurs de ces deux études ont rapporté une splénomégalie, une prolifération importante des lymphocytes T chez les souris C/EBP $\beta^{-/-}$, mais l'analyse des DCs n'avait pas été réalisée. Nous démontrons par ailleurs dans cette thèse l'importance de C/EBP β dans les fonctions tolérogènes des cellules dendritiques. Ainsi, dans l'étude de Tanaka et coll., les lésions/maladies observées chez les souris C/EBP $\beta^{-/-}$ pourraient être dues à la perte des caractéristiques et des fonctions tolérogènes des DCs. Une capacité accrue de ces dernières à activer les lymphocytes T et donc d'induire une réponse immunitaire exagérée pourrait être à l'origine du développement d'une pathologie auto-immune.

Pour évaluer cette hypothèse, il serait intéressant de générer des souris transgéniques qui surexpriment le C/EBP β sous le contrôle du promoteur CD11c et vérifier si ces souris sont moins susceptibles de développer des maladies auto-immunes telles que le diabète de type 1 et l'EAE, par exemple.

Dans le chapitre 4, nous avons démontré l'implication de la PI3K dans la régulation de la production de cytokines par les DCs et plus particulièrement de celles impliquées dans la conversion des lymphocytes T naïfs en Th17. Nous avons démontré l'importance de C/EBP β dans la régulation de la production d'IL-12p40 et d'IL-23p19 qui résulte en la production d'IL-23. Dans ce chapitre, nous avons aussi démontré que lorsque C/EBP β est inhibé chez les GM/DCs, ces dernières sont capables d'induire la conversion des lymphocytes T naïfs en Th17, et ce, que la PI3K soit inhibée ou non. En effet, les DCs de souris C/EBP $\beta^{-/-}$ produisent des quantités importantes d'IL-12p40, et ce, que la PI3K soit inhibée ou non, ce qui induit la conversion des lymphocytes T naïfs en Th17 même s'il y a peu d'IL-23 produite. Ces résultats inattendus indiquent que l'IL-12p40 pourrait aussi induire la conversion des lymphocytes T naïfs en Th17. Tous ces résultats sont résumés dans la figure 3.

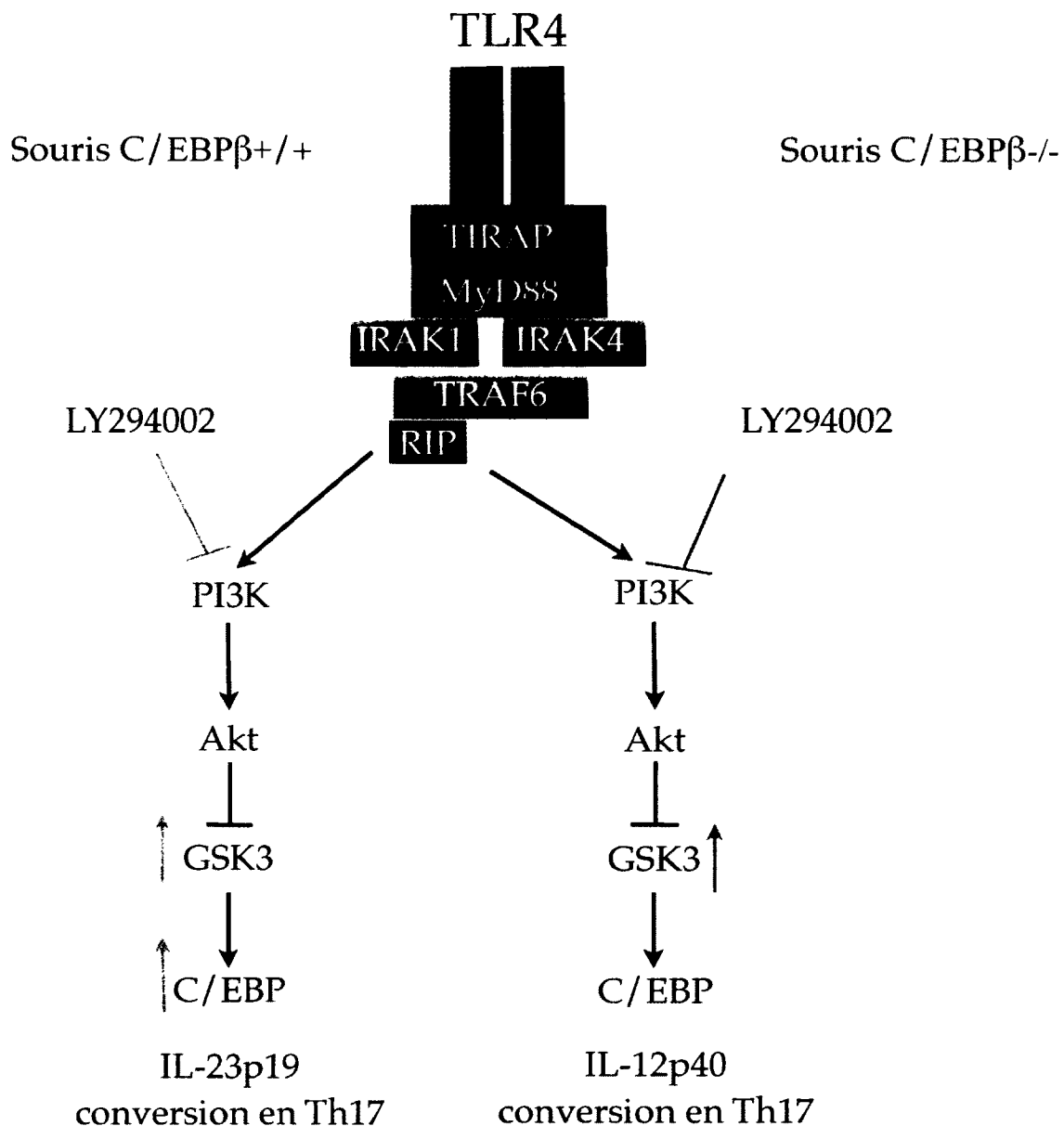


Figure 3. Résumé des résultats présentés dans le chapitre 4

Lorsque la PI3K est inhibée chez les souris NOD ou *C/EBPβ^{+/+}*, nous observons une augmentation de la liaison à l'ADN de *C/EBPβ* ainsi qu'une augmentation de la production d'IL-23p19, ce qui se traduit par une production accrue d'IL-23. Ceci mène à la conversion des T naïfs en Th17. Chez les souris *C/EBPβ^{-/-}*, nous n'observons pas d'augmentation d'IL-23p19 ou d'IL-23, mais nous remarquons plutôt une augmentation importante de la production d'IL-12p40 ce qui favorise également la conversion des T naïfs en Th17.

Plusieurs études ont démontré l'implication des Th17 dans les maladies auto-immunes telles que le diabète de type 1 et l'EAE (Eixarch *et al.*, 2013; Kleinewietfeld *et al.*, 2013; Ryba-Stanislawowska *et al.*, 2013; Shao *et al.*, 2012). Chez les souris NOD, il y a une concentration importante de cytokines de type Th1 au niveau des organes lymphoïdes ce qui promeut la conversion des lymphocytes T naïfs en Th1. Plusieurs études ont été réalisées avec des lymphocytes Th17 chez la souris NOD. En effet, l'injection des Th17 à des souris NOD-SCID induit le diabète, cependant, ces études montrent que les Th17 générés *ex vivo* peuvent, une fois injectés se convertir en Th1 (Bending *et al.*, 2009; Martin-Orozco *et al.*, 2009). Ces études démontrent la complexité de l'étude des Th17 chez la souris NOD. Cependant, l'étude du DT1 chez les souris NOD déficientes en récepteur de IL-21 a révélé l'implication des Th17 dans la pathologie puisque ces dernières sont protégées contre la maladie (Spolski *et al.*, 2008). Nos résultats démontrent qu'une augmentation de la liaison à l'ADN de C/EBP β résulte en une augmentation de l'expression d'IL-23 et qu'une inhibition de la liaison à l'ADN de C/EBP β résulte en une augmentation de la production IL-12p40. Dans les deux cas, nous observons une augmentation de la conversion des T naïfs en Th17, ce qui démontre la nécessité d'un excellent contrôle de la liaison à l'ADN de C/EBP β chez les DCs afin de contrôler la génération Th17 et ainsi le développement du DT1.

Dans cette thèse, nous avons démontré que les GM/DCs résistent à la maturation et que cette résistance est causée par l'activation de C/EBP β et par l'absence d'induction de RelB. Également, nous avons démontré que l'activation de C/EBP β est médiée par la GSK3 et par la MAPK p38 chez les tDCs. Dans la littérature, il a été rapporté que la GSK3 peut être phosphorylée et inactivée par la PI3K (Cohen et Frame, 2001). Dans le chapitre 4, nous avons démontré qu'il y avait une augmentation de la liaison de C/EBP β à l'ADN lors de l'inhibition de la PI3K. Nous avons aussi démontré qu'il n'y avait pas d'augmentation significative de l'expression des molécules de costimulation lorsque la PI3K est inhibée. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus à l'aide des souris déficientes en C/EBP β qui montraient une augmentation importante de l'expression des molécules de costimulation. En effet, l'augmentation de la liaison de C/EBP β sur l'ADN, observée lors de l'inhibition de la PI3K, démontre une fois de plus son importance dans la régulation de l'expression des molécules de costimulation. En pareille situation, nous avons aussi observé une baisse importante de la

production d'IL-10. Cette diminution de la production d'IL-10 corrèle avec une baisse de la liaison de CREB et d'AP-1 sur l'ADN. Nous avons démontré que l'inhibition de la liaison à l'ADN de ces deux facteurs de transcription corrélait fortement avec la diminution de l'expression et de la production de l'IL-10 ce qui suggère que ces deux facteurs de transcription régulent l'expression de ce gène (Guindi *et al.*, 2012) (Guindi *et al.* Soumis). Une étude a montré que la GSK3 peut phosphoryler AP-1 et CREB ce qui diminue leur capacité de transactivation (Gotschel *et al.*, 2008). Comme l'inhibition de la PI3K diminue la phosphorylation de la GSK3 β , il est plausible que cette dernière soit responsable de cette diminution. Nous avons aussi démontré que l'inhibition de la PI3K chez les GM/DCs de souris C/EBP β ^{-/-} n'altère pas la production tardive d'IL-10 comparativement aux souris contrôles ce qui nous permet de conclure que C/EBP β est important pour l'induction précoce de l'IL-10, mais qu'il n'est pas requis pour la production tardive.

Nous avons aussi démontré que l'inhibition de la PI3K chez les GM/DCs permet d'induire la conversion des lymphocytes T naïfs en Th17. Cette conversion corrèle avec une augmentation de la production d'IL-23, de TGF- β et d'IL-6. Ces trois cytokines ont été décrites pour être essentielle au maintien et à la survie des Th17 ainsi que pour l'augmentation de leur production d'IL-17 (McGeachy *et al.*, 2007). De plus, chez les souris déficientes en C/EBP β , nous avons observé une expression importante de l'ARNm ainsi que de la sécrétion d'IL-12p40. L'IL-12p40 peut s'associer avec l'IL-12p35 pour former l'IL-12p70 ou avec l'IL-23p19 pour former l'IL-23 (Lupardus et Garcia, 2008). Les résultats que nous avons obtenus ne montrent pas d'augmentation de ces sous-unités chez les GM/DCs de souris C/EBP β ^{-/-}. Cependant, une étude a montré que la production d'IL-12p35 et d'IL-12p40 est régulée de façon opposée par le C/EBP β (Gorgoni *et al.*, 2002). Cette étude a montré que, chez des macrophages de souris déficientes en C/EBP β , il y a une augmentation de la production d'IL-12p40 et une diminution importante de l'IL-12p35. Nous avons aussi observé une conversion importante des lymphocytes T naïfs en Th17, et ce, que la PI3K soit inhibée ou non. Ces résultats suggèrent que C/EBP β est impliqué dans la conversion des lymphocytes T naïfs en Th17 mais que ce dernier n'est probablement pas le seul facteur de transcription impliqué. En effet, en plus d'affecter C/EBP β , nous avons démontré que l'inhibition de la PI3K module la liaison à l'ADN de plusieurs facteurs de transcription. Il est donc possible que d'autres facteurs de transcription soient impliqués dans la

régulation de l'IL-23p19 et de l'IL-12p40 notamment. Lorsque C/EBP β est absent, on remarque une production accrue de l'IL-12p40, ce qui démontre un rôle répresseur de C/EBP β dans la régulation de l'expression de ce gène. L'IL-12p40 peut dimériser pour former l'IL-12p80, une cytokine peu caractérisée à ce jour. L'IL-12p40 peut aussi être sécrétée sous forme monomérique et se lier au récepteur de l'IL-12, IL-12R β 1 (Gately *et al.*, 1996; Gillessen *et al.*, 1995; Mattner *et al.*, 1993). IL-12R β 1 peut être retrouvée sous forme dimérique liée par un lien disulfure ou sous forme oligomérique. Aucune étude n'a cependant déterminé quelle forme du récepteur est liée par l'IL-12p80 (Chua *et al.*, 1994; Chua *et al.*, 1995). L'IL-23 lie le récepteur formé des sous-unités IL-23R et IL-12R β 1 (Miossec et Kolls, 2012). Il est donc possible que chez les GM/DCs de souris C/EBP β ^{-/-} que l'IL-12p40 sous forme homodimérique ou monomérique puisse induire la conversion des lymphocytes T naïfs en Th17. Afin de tester cette hypothèse, des expériences devraient être effectuées en utilisant des DCs provenant de la moelle osseuse de souris déficientes en diverses sous-unités de l'IL-12/IL-23. En utilisant la moelle osseuse de souris déficientes en IL-12p40, nous pourrions déterminer l'importance de cette cytokine dans la conversion des lymphocytes T naïfs en Th17. Les GM/DCs pourraient aussi être générées à partir de souris déficientes en IL-12p40 et en C/EBP β . Les résultats de ces expériences devraient aussi être comparés aux résultats obtenus avec des GM/DCs générées à partir de la moelle osseuse de souris déficientes en IL-23p19 afin de s'assurer que l'effet observé n'est pas dû à la perte de l'IL-23, même si aucune quantité importante n'a été détectée par ELISA. Ces expériences peuvent aussi être combinées avec des essais de conversion où des inhibiteurs de l'IL-12p40, tel que des anticorps bloquants, seraient utilisés nous permettant de confirmer d'une autre façon l'implication de l'IL-12p40 dans la conversion des T naïfs en Th17. Récemment, des ELISA ont aussi été développés afin de mesurer l'IL-12p80 sécrétée dans le surnageant cellulaire. Il serait donc intéressant de mesurer les concentrations produites de cette cytokine par les GM/DCs afin de mieux comprendre si les effets observés dans les expériences présentées plus haut sont médiés par l'IL-12p40 ou l'IL-12p80.

9 Conclusion

Dans cette thèse, j'ai identifié et caractérisé les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des fonctions tolérogènes des cellules dendritiques à l'aide d'un modèle développé dans le laboratoire soit les GM/DCs. Comme nous et plusieurs autres groupes l'avons démontré, ces cellules sont impliquées dans la protection contre le diabète de type 1. Notre laboratoire a montré que l'injection de GM-CSF permet de protéger les souris NOD contre le diabète de type 1 et que cette protection est médiée par la génération de cellules dendritiques tolérogènes à partir de précurseurs de la moelle osseuse.

Nous avons développé un modèle de génération de DCs tolérogènes *in vitro*. En cultivant la moelle osseuse de souris NOD en présence de GM-CSF, nous sommes en mesure de générer des DCs qui résistent à la maturation et qui produisent des cytokines anti-inflammatoires. Les DCs ainsi obtenues ne sont pas capables d'induire une activation des lymphocytes T auto-réactifs mais induisent plutôt la conversion des lymphocytes T naïfs en Tregs et favorisent l'expansion des Tregs déjà existants. Notre étude moléculaire des facteurs de transcription et des protéines MAP kinases impliquées a montré que l'activation de ERK1/2 est très importante chez les GM/DCs puisqu'elle induit la liaison d'AP-1 à l'ADN et qu'elle est impliquée dans la production d'IL-10. De plus, l'analyse des complexes de NF- κ B liant l'ADN a révélé l'absence de RelB et un recrutement préférentiel de p65 au promoteur de l'IL-10 chez les GM/DCs.

Nous avons aussi démontré une liaison importante de C/EBP β à l'ADN chez les GM/DCs. Cette liaison est dépendante de l'activation de la voie p38/CREB ainsi que de la GSK3. Une inhibition de la GSK3 résulte en une production accrue d'IL-10 tandis qu'une inhibition de p38 résulte en une diminution de la production d'IL-10 et en une augmentation de la production d'IL-12. L'utilisation de moelle osseuse de souris déficientes en C/EBP β a permis de mieux comprendre l'importance de ce facteur de transcription. Les GM/DCs obtenues de ces souris sont dans un état de maturation important comparativement aux GM/DCs de souris contrôles. Nous avons montré que C/EBP β est essentiel à la production précoce d'IL-10 alors qu'il n'est pas nécessaire pour la production tardive d'IL-10. Ces résultats montrent pour la première fois l'activation de C/EBP β

chez les DCs et permettent de mieux comprendre son implication dans les fonctions tolérogènes des DCs.

Dans le dernier chapitre, nous avons étudié l'importance de la PI3K dans les fonctions tolérogènes des GM/DCs. Cette étude nous a permis de mieux comprendre comment la PI3K module l'activation de la GSK3. Nous avons montré que l'inhibition de la PI3K mène à une augmentation de la liaison de C/EBP β à l'ADN chez les GM/DCs. Les GM/DCs ne présentent aucun changement au niveau de leur maturation et de leur capacité à induire la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ lorsque la PI3K est inhibée. Cependant, comme ces DCs produisent des concentrations importantes d'IL-23, nous avons étudié leur capacité à induire la conversion des lymphocytes T naïfs en Th17. Nous avons démontré que cette conversion est très importante lorsque la PI3K est inhibée. L'utilisation de souris déficientes en C/EBP β nous a permis de mieux comprendre la contribution de ce facteur de transcription chez les DCs dans la différenciation des Th17. Nos résultats suggèrent que le C/EBP β est un régulateur négatif de l'expression du gène de l'IL-12p40.

En somme, les résultats présentés dans cette thèse permettent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires permettant aux cellules dendritiques d'acquérir plusieurs fonctions tolérogéniques. Ces études permettent de cibler plusieurs protéines de différentes voies de signalisation afin d'envisager de nouveaux traitements des maladies auto-immunes. De plus, ces connaissances pourront être transposées à d'autres types de pathologies auto-immunes.

10 Remerciements

Je voudrais remercier le Dr Amrani de m'avoir accueilli aussi longtemps dans son laboratoire. Merci pour les discussions et la liberté de mener mes projets comme je le voulais.

Un merci particulier aux collaborateurs sur ces projets, sans vous rien n'aurait été pareil. Un merci spécial à Anne-Marie Hogue qui faisait un excellent travail avec les souris. Il était tellement agréable de travailler avec toi! Je tiens aussi à remercier les autres étudiants du laboratoire, en particulier Simon et Michaël avec qui j'ai eu à travailler le plus.

Je tiens aussi à remercier les membres de ma famille, car ils ont toujours été là pour moi et ont toujours compris quand je devais aller au laboratoire la fin de semaine ou durant les congés! Je tiens aussi à remercier mes deux amours, Alex et Christophe qui, sans peut-être le savoir, ont joué un rôle important dans toute cette aventure. Je vous aime mes deux cocos. Alex, sans toi je n'y serais jamais arrivé, merci de m'avoir donné le courage et la force!

11 Références

Agace, W.W., and Persson, E.K. (2012). How vitamin A metabolizing dendritic cells are generated in the gut mucosa. *Trends Immunol* 33, 42-48.

Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.H., de Sauvage, F.J., and Gurney, A.L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278, 1910-1914.

Agrawal, A., Dillon, S., Denning, T.L., and Pulendran, B. (2006). ERK1-/- mice exhibit Th1 cell polarization and increased susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 176, 5788-5796.

Akbari, O., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2001). Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2, 725-731.

Allan, R.S., Smith, C.M., Belz, G.T., van Lint, A.L., Wakim, L.M., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2003). Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 301, 1925-1928.

Allman, D., Dalod, M., Asselin-Paturel, C., Delale, T., Robbins, S.H., Trinchieri, G., Biron, C.A., Kastner, P., and Chan, S. (2006). Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Blood* 108, 4025-4034.

Alvarez, D., Vollmann, E.H., and von Andrian, U.H. (2008). Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* 29, 325-342.

Amrani, A., Verdaguer, J., Anderson, B., Utsugi, T., Bou, S., and Santamaria, P. (1999). Perforin-independent beta-cell destruction by diabetogenic CD8(+) T lymphocytes in transgenic nonobese diabetic mice. *J Clin Invest* 103, 1201-1209.

Amrani, A., Verdaguer, J., Serra, P., Tafuro, S., Tan, R., and Santamaria, P. (2000). Progression of autoimmune diabetes driven by avidity maturation of a T-cell population. *Nature* 406, 739-742.

Ananieva, O., Darragh, J., Johansen, C., Carr, J.M., McIlrath, J., Park, J.M., Wingate, A., Monk, C.E., Toth, R., Santos, S.G., *et al.* (2008). The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* 9, 1028-1036.

Angerer, N.D., Du, Y., Nalbant, D., and Williams, S.C. (1999). A short conserved motif is required for repressor domain function in the myeloid-specific transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein epsilon. *J Biol Chem* 274, 4147-4154.

Ardavin, C., Wu, L., Li, C.L., and Shortman, K. (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362, 761-763.

Ardeshtna, K.M., Pizzey, A.R., Devereux, S., and Khwaja, A. (2000). The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96, 1039-1046.

Arias, J., Alberts, A.S., Brindle, P., Claret, F.X., Smeal, T., Karin, M., Feramisco, J., and Montminy, M. (1994). Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* 370, 226-229.

Arrighi, J.F., Rebsamen, M., Rousset, F., Kindler, V., and Hauser, C. (2001). A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol* 166, 3837-3845.

Atkinson, M.A., and Leiter, E.H. (1999). The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nat Med* 5, 601-604.

Ato, M., Stager, S., Engwerda, C.R., and Kaye, P.M. (2002). Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol* 3, 1185-1191.

Avni, O., Lee, D., Macian, F., Szabo, S.J., Glimcher, L.H., and Rao, A. (2002). T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat Immunol* 3, 643-651.

Baekkeskov, S., Aanstoot, H.J., Christgau, S., Reetz, A., Solimena, M., Cascalho, M., Folli, F., Richter-Olesen, H., and De Camilli, P. (1990). Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347, 151-156.

Baekkeskov, S., Nielsen, J.H., Marnier, B., Bilde, T., Ludvigsson, J., and Lernmark, A. (1982). Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* 298, 167-169.

Bailey-Bucktrout, S.L., Caulkins, S.C., Goings, G., Fischer, J.A., Dzionek, A., and Miller, S.D. (2008). Cutting edge: central nervous system plasmacytoid dendritic cells regulate the severity of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 180, 6457-6461.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Bang, U.C., Brandt, L., Benfield, T., and Jensen, J.E. (2012). Changes in 1,25-dihydroxyvitamin D and 25-hydroxyvitamin D are associated with maturation of regulatory T lymphocytes in patients with chronic pancreatitis: a randomized controlled trial. *Pancreas* 41, 1213-1218.

Barberis, L., Pasquali, C., Bertschy-Meier, D., Cuccurullo, A., Costa, C., Ambrogio, C., Vilbois, F., Chiarle, R., Wymann, M., Altruda, F., *et al.* (2009). Leukocyte transmigration is modulated by

chemokine-mediated PI3Kgamma-dependent phosphorylation of vimentin. *Eur J Immunol* 39, 1136-1146.

Barrat, F.J., Meeker, T., Gregorio, J., Chan, J.H., Uematsu, S., Akira, S., Chang, B., Duramad, O., and Coffman, R.L. (2005). Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 202, 1131-1139.

Bell, D., Young, J.W., and Banchereau, J. (1999). Dendritic cells. *Adv Immunol* 72, 255-324.
Belz, G.T., and Nutt, S.L. (2012). Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol* 12, 101-113.

Bendelac, A., Carnaud, C., Boitard, C., and Bach, J.F. (1987). Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J Exp Med* 166, 823-832.

Bending, D., De la Pena, H., Veldhoen, M., Phillips, J.M., Uyttenhove, C., Stockinger, B., and Cooke, A. (2009). Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J Clin Invest* 119, 565-572.

Benwell, R.K., and Lee, D.R. (2010). Essential and synergistic roles of IL1 and IL6 in human Th17 differentiation directed by TLR ligand-activated dendritic cells. *Clin Immunol* 134, 178-187.

Berthelot, J.M., Jamin, C., Amrouche, K., Le Goff, B., Maugars, Y., and Youinou, P. (2012). Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint Bone Spine*.

Besin, G., Gaudreau, S., Dumont-Blanchette, E., Menard, M., Guindi, C., Dupuis, G., and Amrani, A. (2011). IFN regulatory factors 4 and 8 expression in the NOD mouse. *Clin Dev Immunol* 2011, 374859.

Besin, G., Gaudreau, S., Menard, M., Guindi, C., Dupuis, G., and Amrani, A. (2008). Thymic stromal lymphopoietin and thymic stromal lymphopoietin-conditioned dendritic cells induce regulatory T-cell differentiation and protection of NOD mice against diabetes. *Diabetes* 57, 2107-2117.

Beurel, E., and Jope, R.S. (2008). Differential regulation of STAT family members by glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 283, 21934-21944.

Bi, L., Okabe, I., Bernard, D.J., and Nussbaum, R.L. (2002). Early embryonic lethality in mice deficient in the p110beta catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mamm Genome* 13, 169-172.

Bi, L., Okabe, I., Bernard, D.J., Wynshaw-Boris, A., and Nussbaum, R.L. (1999). Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 274, 10963-10968.

- Bijur, G.N., and Jope, R.S. (2003). Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* 14, 2415-2419.
- Biswas, P.S., Gupta, S., Chang, E., Song, L., Stirzaker, R.A., Liao, J.K., Bhagat, G., and Pernis, A.B. (2010). Phosphorylation of IRF4 by ROCK2 regulates IL-17 and IL-21 production and the development of autoimmunity in mice. *J Clin Invest* 120, 3280-3295.
- Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. (2001). Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 294, 1540-1543.
- Bluestone, J.A., and Abbas, A.K. (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3, 253-257.
- Bluestone, J.A., Herold, K., and Eisenbarth, G. (2010). Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 464, 1293-1300.
- Boisson-Dupuis, S., Kong, X.F., Okada, S., Cypowyj, S., Puel, A., Abel, L., and Casanova, J.L. (2012). Inborn errors of human STAT1: allelic heterogeneity governs the diversity of immunological and infectious phenotypes. *Curr Opin Immunol* 24, 364-378.
- Bollrath, J., and Greten, F.R. (2009). IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO Rep* 10, 1314-1319.
- Bonasio, R., Scimone, M.L., Schaerli, P., Gräbe, N., Lichtman, A.H., and von Andrian, U.H. (2006). Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat Immunol* 7, 1092-1100.
- Boyle, W.J., Smeal, T., Defize, L.H., Angel, P., Woodgett, J.R., Karin, M., and Hunter, T. (1991). Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* 64, 573-584.
- Bradley, M.N., Zhou, L., and Smale, S.T. (2003). C/EBP β regulation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Mol Cell Biol* 23, 4841-4858.
- Bresson, D., Togher, L., Rodrigo, E., Chen, Y., Bluestone, J.A., Herold, K.C., and von Herrath, M. (2006). Anti-CD3 and nasal proinsulin combination therapy enhances remission from recent-onset autoimmune diabetes by inducing Tregs. *J Clin Invest* 116, 1371-1381.
- Brocker, T., Riedinger, M., and Karjalainen, K. (1997). Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 185, 541-550.
- Brusko, T., Wasserfall, C., McGrail, K., Schatz, R., Viener, H.L., Schatz, D., Haller, M., Rockell, J., Gottlieb, P., Clare-Salzler, M., *et al.* (2007). No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 56, 604-612.

- Brusko, T.M., Wasserfall, C.H., Clare-Salzler, M.J., Schatz, D.A., and Atkinson, M.A. (2005). Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4⁺ CD25⁺ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 54, 1407-1414.
- Brustle, A., Heink, S., Huber, M., Rosenplanter, C., Stadelmann, C., Yu, P., Arpaia, E., Mak, T.W., Kamradt, T., and Lohoff, M. (2007). The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* 8, 958-966.
- Buenafe, A.C., and Bourdette, D.N. (2007). Lipopolysaccharide pretreatment modulates the disease course in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 182, 32-40.
- Bullock, B.P., and Habener, J.F. (1998). Phosphorylation of the cAMP response element binding protein CREB by cAMP-dependent protein kinase A and glycogen synthase kinase-3 alters DNA-binding affinity, conformation, and increases net charge. *Biochemistry* 37, 3795-3809.
- Burkly, L., Hession, C., Ogata, L., Reilly, C., Marconi, L.A., Olson, D., Tizard, R., Cate, R., and Lo, D. (1995). Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 373, 531-536.
- Carvalho, T., Rodrigues, A., Lopes, A., Ines, L., Velada, I., Ribeiro, A., Martinho, A., Silva, J.A., Pais, M.L., and Paiva, A. (2012). Tolerogenic versus inflammatory activity of peripheral blood monocytes and dendritic cells subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol* 2012, 934161.
- Cassel, T.N., and Nord, M. (2003). C/EBP transcription factors in the lung epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, L773-781.
- Castellino, F., Zhong, G., and Germain, R.N. (1997). Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum Immunol* 54, 159-169.
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., and Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388, 782-787.
- Centrella, M., Christakos, S., and McCarthy, T.L. (2004). Skeletal hormones and the C/EBP and Runx transcription factors: interactions that integrate and redefine gene expression. *Gene* 342, 13-24.
- Chang, L.H., Huang, H.S., Wu, P.T., Jou, I.M., Pan, M.H., Chang, W.C., Wang, D.D., and Wang, J.M. (2012). Role of macrophage CCAAT/enhancer binding protein delta in the pathogenesis of rheumatoid arthritis in collagen-induced arthritic mice. *PLoS One* 7, e45378.
- Chano F, Descoteaux A. (2002). Modulation of lipopolysaccharide-induced NF-IL6 activation by protein kinase C-alpha in a mouse macrophage cell line. *Eur J Immunol* 32:2897-904.

- Chen, G., Tan, C.S., Teh, B.K., and Lu, J. (2011). Molecular mechanisms for synchronized transcription of three complement C1q subunit genes in dendritic cells and macrophages. *J Biol Chem* 286, 34941-34950.
- Chen, J., Falk, M., Euskirchen, E., U, K.T., Suchanek, T.H., Ustin, S.L., Bond, B.J., Brosnoff, K.D., Phillips, N., and Bi, R. (2002). Biophysical controls of carbon flows in three successional Douglas-fir stands based on eddy-covariance measurements. *Tree Physiol* 22, 169-177.
- Chen, Q., Yang, W., Gupta, S., Biswas, P., Smith, P., Bhagat, G., and Pernis, A.B. (2008). IRF-4-binding protein inhibits interleukin-17 and interleukin-21 production by controlling the activity of IRF-4 transcription factor. *Immunity* 29, 899-911.
- Chen, R.H., Juo, P.C., Curran, T., and Blenis, J. (1996). Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances its transforming activity. *Oncogene* 12, 1493-1502.
- Chen, W. (2006). Dendritic cells and (CD4+)CD25+ T regulatory cells: crosstalk between two professionals in immunity versus tolerance. *Front Biosci* 11, 1360-1370.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198, 1875-1886.
- Chen, Z., Laurence, A., Kanno, Y., Pacher-Zavisin, M., Zhu, B.M., Tato, C., Yoshimura, A., Hennighausen, L., and O'Shea, J.J. (2006a). Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8137-8142.
- Chen, Z., Marsden, P.A., and Gorczynski, R.M. (2006b). Cloning and characterization of the human CD200 promoter region. *Mol Immunol* 43, 579-587.
- Chorny, A., Gonzalez-Rey, E., Fernandez-Martin, A., Pozo, D., Ganea, D., and Delgado, M. (2005). Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells with therapeutic effects on autoimmune disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13562-13567.
- Christie, M.R., Genovese, S., Cassidy, D., Bosi, E., Brown, T.J., Lai, M., Bonifacio, E., and Bottazzo, G.F. (1994). Antibodies to islet 37k antigen, but not to glutamate decarboxylase, discriminate rapid progression to IDDM in endocrine autoimmunity. *Diabetes* 43, 1254-1259.
- Chrivia, J.C., Kwok, R.P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R., and Goodman, R.H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365, 855-859.
- Chua, A.O., Chizzonite, R., Desai, B.B., Truitt, T.P., Nunes, P., Minetti, L.J., Warriar, R.R., Presky, D.H., Levine, J.F., Gately, M.K., *et al.* (1994). Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J Immunol* 153, 128-136.

Chua, A.O., Wilkinson, V.L., Presky, D.H., and Gubler, U. (1995). Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component. *J Immunol* 155, 4286-4294.

Cloutier, A., Guindi, C., Larivee, P., Dubois, C.M., Amrani, A., and McDonald, P.P. (2009). Inflammatory cytokine production by human neutrophils involves C/EBP transcription factors. *J Immunol* 182, 563-571.

Cohen, P., and Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 769-776.
Comb, M., Birnberg, N.C., Seasholtz, A., Herbert, E., and Goodman, H.M. (1986). A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element. *Nature* 323, 353-356.

Cooper, C., Henderson, A., Artandi, S., Avitahl, N., and Calame, K. (1995). Ig/EBP (C/EBP gamma) is a transdominant negative inhibitor of C/EBP family transcriptional activators. *Nucleic Acids Res* 23, 4371-4377.

Corcoran, L., Ferrero, I., Vremec, D., Lucas, K., Waithman, J., O'Keeffe, M., Wu, L., Wilson, A., and Shortman, K. (2003). The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells. *J Immunol* 170, 4926-4932.

Corinti, S., Albanesi, C., la Sala, A., Pastore, S., and Girolomoni, G. (2001). Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol* 166, 4312-4318.

Costa, C., Barberis, L., Ambrogio, C., Manazza, A.D., Patrucco, E., Azzolino, O., Neilsen, P.O., Ciralo, E., Altruda, F., Prestwich, G.D., *et al.* (2007). Negative feedback regulation of Rac in leukocytes from mice expressing a constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14354-14359.

Cresswell, P. (1996). Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84, 505-507.
Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.

Csoka, B., Nemeth, Z.H., Virag, L., Gergely, P., Leibovich, S.J., Pacher, P., Sun, C.X., Blackburn, M.R., Vizi, E.S., Deitch, E.A., *et al.* (2007). A2A adenosine receptors and C/EBPbeta are crucially required for IL-10 production by macrophages exposed to *Escherichia coli*. *Blood* 110, 2685-2695.

Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Di Paola, R., Muia, C., Crisafulli, C., Dugo, L., Collin, M., Britti, D., Caputi, A.P., and Thiemermann, C. (2006). Glycogen synthase kinase-3beta inhibition attenuates the degree of arthritis caused by type II collagen in the mouse. *Clin Immunol* 120, 57-67.

Dahlen, E., Hedlund, G., and Dawe, K. (2000). Low CD86 expression in the nonobese diabetic mouse results in the impairment of both T cell activation and CTLA-4 up-regulation. *J Immunol* 164, 2444-2456.

Davidson, T.S., DiPaolo, R.J., Andersson, J., and Shevach, E.M. (2007). Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 178, 4022-4026.

- De Smedt, T., Pajak, B., Muraille, E., Lespagnard, L., Heinen, E., De Baetselier, P., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1996). Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* 184, 1413-1424.
- Debray-Sachs, M., Carnaud, C., Boitard, C., Cohen, H., Gresser, I., Bedossa, P., and Bach, J.F. (1991). Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN gamma. *J Autoimmun* 4, 237-248.
- den Haan, J.M., Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 192, 1685-1696.
- Dendrou, C.A., and Wicker, L.S. (2008). The IL-2/CD25 pathway determines susceptibility to T1D in humans and NOD mice. *J Clin Immunol* 28, 685-696.
- Deng, T., and Karin, M. (1994). c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature* 371, 171-175.
- Descombes, P., and Schibler, U. (1991). A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* 67, 569-579.
- Dhodapkar, M.V., Steinman, R.M., Krasovsky, J., Munz, C., and Bhardwaj, N. (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 193, 233-238.
- Diana, J., Gahzarian, L., Simoni, Y., and Lehuen, A. (2011). Innate immunity in type 1 diabetes. *Discov Med* 11, 513-520.
- DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E., and Karin, M. (1997). A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 388, 548-554.
- Dillon, S., Agrawal, A., Van Dyke, T., Landreth, G., McCauley, L., Koh, A., Maliszewski, C., Akira, S., and Pulendran, B. (2004). A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol* 172, 4733-4743.
- Ding, D., Mehta, H., McCune, W.J., and Kaplan, M.J. (2006). Aberrant phenotype and function of myeloid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 177, 5878-5889.
- Djuretic, I.M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A., and Ansel, K.M. (2007). Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* 8, 145-153.

- Dugo, L., Collin, M., Allen, D.A., Patel, N.S., Bauer, I., Mervaala, E.M., Louhelainen, M., Foster, S.J., Yaqoob, M.M., and Thiemermann, C. (2005). GSK-3 β inhibitors attenuate the organ injury/dysfunction caused by endotoxemia in the rat. *Crit Care Med* 33, 1903-1912.
- Dunn, K.L., Espino, P.S., Drobic, B., He, S., and Davie, J.R. (2005). The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling. *Biochem Cell Biol* 83, 1-14.
- Edelson, B.T., Kc, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., *et al.* (2010). Peripheral CD103⁺ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 α ⁺ conventional dendritic cells. *J Exp Med* 207, 823-836.
- Ehlers, M., Fukuyama, H., McGaha, T.L., Aderem, A., and Ravetch, J.V. (2006). TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b autoantibodies in SLE. *J Exp Med* 203, 553-561.
- Eickholt, B.J., Walsh, F.S., and Doherty, P. (2002). An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signaling. *J Cell Biol* 157, 211-217.
- Eixarch, H., Mansilla, M.J., Costa, C., Kunkel, S.L., Montalban, X., Godessart, N., and Espejo, C. (2013). Inhibition of delta-like ligand 4 decreases Th1/Th17 response in a mouse model of multiple sclerosis. *Neurosci Lett*.
- Elcombe SE, Naqvi S, Van Den Bosch MW, MacKenzie KF, Cianfanelli F, Brown GD, Arthur JS. (2013). Dectin-1 regulates IL-10 production via a MSK1/2 and CREB dependent pathway and promotes the induction of regulatory macrophage markers. *PLoS One* 8:e60086.
- Eldar-Finkelman, H. (2002). Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol Med* 8, 126-132.
- Erlich, H.A., Valdes, A.M., McDevitt, S.L., Simen, B.B., Blake, L.A., McGowan, K.R., Todd, J.A., Rich, S.S., and Noble, J.A. (2013). Next Generation Sequencing Reveals the Association of DRB3*02:02 With Type 1 Diabetes. *Diabetes* 62, 2618-2622.
- Esashi, E., Wang, Y.H., Perng, O., Qin, X.F., Liu, Y.J., and Watowich, S.S. (2008). The signal transducer STAT5 inhibits plasmacytoid dendritic cell development by suppressing transcription factor IRF8. *Immunity* 28, 509-520.
- Escors, D., Lopes, L., Lin, R., Hiscott, J., Akira, S., Davis, R.J., and Collins, M.K. (2008). Targeting dendritic cell signaling to regulate the response to immunization. *Blood* 111, 3050-3061.
- Escribano, C., Delgado-Martin, C., and Rodriguez-Fernandez, J.L. (2009). CCR7-dependent stimulation of survival in dendritic cells involves inhibition of GSK3 β . *J Immunol* 183, 6282-6295.

- Esensten, J.H., Lee, M.R., Glimcher, L.H., and Bluestone, J.A. (2009). T-bet-deficient NOD mice are protected from diabetes due to defects in both T cell and innate immune system function. *J Immunol* 183, 75-82.
- Fairchild, P.J., and Austyn, J.M. (1990). Thymic dendritic cells: phenotype and function. *Int Rev Immunol* 6, 187-196.
- Falcone, M., Lee, J., Patstone, G., Yeung, B., and Sarvetnick, N. (1998). B lymphocytes are crucial antigen-presenting cells in the pathogenic autoimmune response to GAD65 antigen in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 161, 1163-1168.
- Fantini, M.C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P.R., and Neurath, M.F. (2004). Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 172, 5149-5153.
- Fehr, E.M., Spoerl, S., Heyder, P., Herrmann, M., Bekeredjian-Ding, I., Blank, N., Lorenz, H.M., and Schiller, M. (2012). Apoptotic-cell-derived membrane vesicles induce an alternative maturation of human dendritic cells which is disturbed in SLE. *J Autoimmun.*
- Feili-Hariri, M., Dong, X., Alber, S.M., Watkins, S.C., Salter, R.D., and Morel, P.A. (1999). Immunotherapy of NOD mice with bone marrow-derived dendritic cells. *Diabetes* 48, 2300-2308.
- Feili-Hariri, M., Falkner, D.H., Gambotto, A., Papworth, G.D., Watkins, S.C., Robbins, P.D., and Morel, P.A. (2003). Dendritic cells transduced to express interleukin-4 prevent diabetes in nonobese diabetic mice with advanced insulinitis. *Hum Gene Ther* 14, 13-23.
- Feili-Hariri, M., and Morel, P.A. (2001). Phenotypic and functional characteristics of BM-derived DC from NOD and non-diabetes-prone strains. *Clin Immunol* 98, 133-142.
- Ferraro, A., Socci, C., Stabilini, A., Valle, A., Monti, P., Piemonti, L., Nano, R., Olek, S., Maffi, P., Scavini, M., *et al.* (2011). Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 60, 2903-2913.
- Fiol, C.J., Williams, J.S., Chou, C.H., Wang, Q.M., Roach, P.J., and Andrisani, O.M. (1994). A secondary phosphorylation of CREB341 at Ser129 is required for the cAMP-mediated control of gene expression. A role for glycogen synthase kinase-3 in the control of gene expression. *J Biol Chem* 269, 32187-32193.
- Fong, A., and Sun, S.C. (2002). Genetic evidence for the essential role of beta-transducin repeat-containing protein in the inducible processing of NF-kappa B2/p100. *J Biol Chem* 277, 22111-22114.
- Foulkes, N.S., and Sassone-Corsi, P. (1992). More is better: activators and repressors from the same gene. *Cell* 68, 411-414.

Francisco, L.M., Sage, P.T., and Sharpe, A.H. (2010). The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 236, 219-242.

Friedman, A.D. (2007). Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 26, 6816-6828.

Fujino-Kurihara, H., Fujita, H., Hakura, A., Nonaka, K., and Tarui, S. (1985). Morphological aspects on pancreatic islets of non-obese diabetic (NOD) mice. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 49, 107-120.

Gately, M.K., Carvajal, D.M., Connaughton, S.E., Gillessen, S., Warriar, R.R., Kolinsky, K.D., Wilkinson, V.L., Dwyer, C.M., Higgins, G.F., Jr., Podlaski, F.J., *et al.* (1996). Interleukin-12 antagonist activity of mouse interleukin-12 p40 homodimer in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 795, 1-12.

Gaudreau, S., Guindi, C., Menard, M., Benabdallah, A., Dupuis, G., and Amrani, A. (2010). GM-CSF induces bone marrow precursors of NOD mice to skew into tolerogenic dendritic cells that protect against diabetes. *Cell Immunol* 265, 31-36.

Gaudreau, S., Guindi, C., Menard, M., Besin, G., Dupuis, G., and Amrani, A. (2007). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prevents diabetes development in NOD mice by inducing tolerogenic dendritic cells that sustain the suppressive function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 179, 3638-3647.

Geering, B., Cutillas, P.R., Nock, G., Gharbi, S.I., and Vanhaesebroeck, B. (2007). Class IA phosphoinositide 3-kinases are obligate p85-p110 heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7809-7814.

Geissmann, F., Revy, P., Brousse, N., Lepelletier, Y., Folli, C., Durandy, A., Chambon, P., and Dy, M. (2003). Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. *J Exp Med* 198, 623-634.

GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A., van Rijt, L.S., Muskens, F., Kool, M., Baas, C., Thielemans, K., Bennett, C., Clausen, B.E., Hoogsteden, H.C., *et al.* (2008). Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 205, 1621-1634.

Ghigo, A., Damilano, F., Braccini, L., and Hirsch, E. (2010). PI3K inhibition in inflammation: Toward tailored therapies for specific diseases. *Bioessays* 32, 185-196.

Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., *et al.* (2010). Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 467, 967-971.

Giannoukakis, N., and Trucco, M. (2012). A role for tolerogenic dendritic cell-induced B-regulatory cells in type 1 diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 19, 279-287.

- Gillessen, S., Carvajal, D., Ling, P., Podlaski, F.J., Stremlo, D.L., Familletti, P.C., Gubler, U., Presky, D.H., Stern, A.S., and Gately, M.K. (1995). Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur J Immunol* 25, 200-206.
- Gomard, T., Michaud, H.A., Tempe, D., Thiolon, K., Pelegrin, M., and Piechaczyk, M. (2010). An NF-kappaB-dependent role for JunB in the induction of proinflammatory cytokines in LPS-activated bone marrow-derived dendritic cells. *PLoS One* 5, e9585.
- Gonzalez, G.A., and Montminy, M.R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59, 675-680.
- Gorgoni, B., Maritano, D., Marthyn, P., Righi, M., and Poli, V. (2002). C/EBP beta gene inactivation causes both impaired and enhanced gene expression and inverse regulation of IL-12 p40 and p35 mRNAs in macrophages. *J Immunol* 168, 4055-4062.
- Gotschel, F., Kern, C., Lang, S., Sparna, T., Markmann, C., Schwager, J., McNelly, S., von Weizsacker, F., Laufer, S., Hecht, A., *et al.* (2008). Inhibition of GSK3 differentially modulates NF-kappaB, CREB, AP-1 and beta-catenin signaling in hepatocytes, but fails to promote TNF-alpha-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 314, 1351-1366.
- Goubier, A., Dubois, B., Gheit, H., Joubert, G., Villard-Truc, F., Asselin-Paturel, C., Trinchieri, G., and Kaiserlian, D. (2008). Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* 29, 464-475.
- Gran, B., Zhang, G.X., Yu, S., Li, J., Chen, X.H., Ventura, E.S., Kamoun, M., and Rostami, A. (2002). IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol* 169, 7104-7110.
- Grimes, C.A., and Joep, R.S. (2001a). CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *J Neurochem* 78, 1219-1232.
- Grimes, C.A., and Joep, R.S. (2001b). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 65, 391-426.
- Guindi, C., Menard, M., Cloutier, A., Gaudreau, S., Besin, G., Larivee, P., McDonald, P.P., Dupuis, G., and Amrani, A. (2012). Differential role of NF-kappaB, ERK1/2 and AP-1 in modulating the immunoregulatory functions of bone marrow-derived dendritic cells from NOD mice. *Cell Immunol* 272, 259-268.
- Gutcher, I., Urich, E., Wolter, K., Prinz, M., and Becher, B. (2006). Interleukin 18-independent engagement of interleukin 18 receptor-alpha is required for autoimmune inflammation. *Nat Immunol* 7, 946-953.
- Hackstein, H., and Thomson, A.W. (2004). Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* 4, 24-34.

- Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2008). Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* 8, 193-204.
- Hanafusa, T., Miyagawa, J., Nakajima, H., Tomita, K., Kuwajima, M., Matsuzawa, Y., and Tarui, S. (1994). The NOD mouse. *Diabetes Res Clin Pract* 24 Suppl, S307-311.
- Harizi, H., Limem, I., and Gualde, N. (2011). CD40 engagement on dendritic cells induces cyclooxygenase-2 and EP2 receptor via p38 and ERK MAPKs. *Immunol Cell Biol* 89, 275-282.
- Harris, T.J., Grosso, J.F., Yen, H.R., Xin, H., Kortylewski, M., Albesiano, E., Hipkiss, E.L., Getnet, D., Goldberg, M.V., Maris, C.H., *et al.* (2007). Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol* 179, 4313-4317.
- Hart, D.N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90, 3245-3287.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194, 769-779.
- Hawkes, C.J., Wasmeier, C., Christie, M.R., and Hutton, J.C. (1996). Identification of the 37-kDa antigen in IDDM as a tyrosine phosphatase-like protein (phogrin) related to IA-2. *Diabetes* 45, 1187-1192.
- Hayward, A.R., and Shreiber, M. (1989). Neonatal injection of CD3 antibody into nonobese diabetic mice reduces the incidence of insulinitis and diabetes. *J Immunol* 143, 1555-1559.
- Hess, J., Angel, P., and Schorpp-Kistner, M. (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117, 5965-5973.
- Hiemstra, H.S., Schloot, N.C., van Veelen, P.A., Willemen, S.J., Franken, K.L., van Rood, J.J., de Vries, R.R., Chaudhuri, A., Behan, P.O., Drijfhout, J.W., *et al.* (2001). Cytomegalovirus in autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3988-3991.
- Hirata, N., Yanagawa, Y., Ogura, H., Satoh, M., Noguchi, M., Matsumoto, M., Togashi, H., Onoe, K., and Iwabuchi, K. (2011). The role of tumor necrosis factor-alpha for interleukin-10 production by murine dendritic cells. *Cell Immunol* 266, 165-171.
- Hirsch, E., Katanaev, V.L., Garlanda, C., Azzolino, O., Pirola, L., Silengo, L., Sozzani, S., Mantovani, A., Altruda, F., and Wymann, M.P. (2000). Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* 287, 1049-1053.
- Hoeflich, K.P., Luo, J., Rubie, E.A., Tsao, M.S., Jin, O., and Woodgett, J.R. (2000). Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406, 86-90.

- Holmannova, D., Kolackova, M., Kondelkova, K., Kunes, P., Krejsek, J., and Andrys, C. (2012). CD200/CD200R paired potent inhibitory molecules regulating immune and inflammatory responses; Part I: CD200/CD200R structure, activation, and function. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 55, 12-17.
- Horwitz, M.S., Bradley, L.M., Harbertson, J., Krah, T., Lee, J., and Sarvetnick, N. (1998). Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med* 4, 781-785.
- Hsu, W., Kerppola, T.K., Chen, P.L., Curran, T., and Chen-Kiang, S. (1994). Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Mol Cell Biol* 14, 268-276.
- Hu, C.Y., Rodriguez-Pinto, D., Du, W., Ahuja, A., Henegariu, O., Wong, F.S., Shlomchik, M.J., and Wen, L. (2007). Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *J Clin Invest* 117, 3857-3867.
- Hu, X., Paik, P.K., Chen, J., Yarilina, A., Kockeritz, L., Lu, T.T., Woodgett, J.R., and Ivashkiv, L.B. (2006). IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* 24, 563-574.
- Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L.C., Korn, J.M., Young, R.A., Lander, E.S., and Hacohen, N. (2001). The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* 294, 870-875.
- Huang, X., Yuang, J., Goddard, A., Foulis, A., James, R.F., Lernmark, A., Pujol-Borrell, R., Rabinovitch, A., Somoza, N., and Stewart, T.A. (1995). Interferon expression in the pancreases of patients with type I diabetes. *Diabetes* 44, 658-664.
- Huber, M., Brustle, A., Reinhard, K., Guralnik, A., Walter, G., Mahiny, A., von Low, E., and Lohoff, M. (2008). IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20846-20851.
- Huber, M., Heink, S., Pagenstecher, A., Reinhard, K., Ritter, J., Visekruna, A., Guralnik, A., Bollig, N., Jeltsch, K., Heinemann, C., *et al.* (2013). IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 123, 247-260.
- Huber, R., Pietsch, D., Panterodt, T., and Brand, K. (2012). Regulation of C/EBPbeta and resulting functions in cells of the monocytic lineage. *Cell Signal* 24, 1287-1296.
- Hultgren, B., Huang, X., Dybdal, N., and Stewart, T.A. (1996). Genetic absence of gamma-interferon delays but does not prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes* 45, 812-817.
- Hwang, E.S., Szabo, S.J., Schwartzberg, P.L., and Glimcher, L.H. (2005). T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 307, 430-433.

Ichikawa, E., Hida, S., Omatsu, Y., Shimoyama, S., Takahara, K., Miyagawa, S., Inaba, K., and Taki, S. (2004). Defective development of splenic and epidermal CD4⁺ dendritic cells in mice deficient for IFN regulatory factor-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3909-3914.

Imamura, T., Imamura, C., Iwamoto, Y., and Sandell, L.J. (2005). Transcriptional Co-activators CREB-binding protein/p300 increase chondrocyte Cd-rap gene expression by multiple mechanisms including sequestration of the repressor CCAAT/enhancer-binding protein. *J Biol Chem* 280, 16625-16634.

Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., and Steinman, R.M. (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 178, 479-488.

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R.M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176, 1693-1702.

Inaba, K., Pack, M., Inaba, M., Sakuta, H., Isdell, F., and Steinman, R.M. (1997). High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med* 186, 665-672.

Ivanov, II, McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133.

Jang, Y.S., Kim, H.A., Park, S.R., Lee, M.R., Park, J.B., and Kim, P.H. (2009). IL-4 stimulates mouse macrophages to express APRIL through p38MAPK and two different downstream molecules, CREB and Stat6. *Cytokine* 47, 43-47.

Jansen, A., Homo-Delarche, F., Hooijkaas, H., Leenen, P.J., Dardenne, M., and Drexhage, H.A. (1994). Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes* 43, 667-675.

Jeong, Y.J., Hong, S.W., Kim, J.H., Jin, D.H., Kang, J.S., Lee, W.J., and Hwang, Y.I. (2011). Vitamin C-treated murine bone marrow-derived dendritic cells preferentially drive naive T cells into Th1 cells by increased IL-12 secretions. *Cell Immunol* 266, 192-199.

Johnson, P.F., Landschulz, W.H., Graves, B.J., and McKnight, S.L. (1987). Identification of a rat liver nuclear protein that binds to the enhancer core element of three animal viruses. *Genes Dev* 1, 133-146.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A.H. (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4⁺ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 192, 1213-1222.

- Joep, R.S., Yuskaitis, C.J., and Beurel, E. (2007). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res* 32, 577-595.
- Judkowski, V., Pinilla, C., Schroder, K., Tucker, L., Sarvetnick, N., and Wilson, D.B. (2001). Identification of MHC class II-restricted peptide ligands, including a glutamic acid decarboxylase 65 sequence, that stimulate diabetogenic T cells from transgenic BDC2.5 nonobese diabetic mice. *J Immunol* 166, 908-917.
- Kandulski, A., Malfertheiner, P., and Wex, T. (2010). Role of regulatory T-cells in *H. pylori*-induced gastritis and gastric cancer. *Anticancer Res* 30, 1093-1103.
- Kared, H., Masson, A., Adle-Biasette, H., Bach, J.F., Chatenoud, L., and Zavala, F. (2005). Treatment with granulocyte colony-stimulating factor prevents diabetes in NOD mice by recruiting plasmacytoid dendritic cells and functional CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells. *Diabetes* 54, 78-84.
- Kasagi, S., Kawano, S., and Kumagai, S. (2011). PD-1 and autoimmunity. *Crit Rev Immunol* 31, 265-295.
- Katz, J., Benoist, C., and Mathis, D. (1993). Major histocompatibility complex class I molecules are required for the development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Eur J Immunol* 23, 3358-3360.
- Keir, M.E., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2007). PD-1 regulates self-reactive CD8+ T cell responses to antigen in lymph nodes and tissues. *J Immunol* 179, 5064-5070.
- Kelly, K.F., and Daniel, J.M. (2006). POZ for effect--POZ-ZF transcription factors in cancer and development. *Trends Cell Biol* 16, 578-587.
- Kim, H.J., Kim, H.O., Lee, K., Baek, E.J., and Kim, H.S. (2010). Two-step maturation of immature DCs with proinflammatory cytokine cocktail and poly(I:C) enhances migratory and T cell stimulatory capacity. *Vaccine* 28, 2877-2886.
- Kim, J.W., Tang, Q.Q., Li, X., and Lane, M.D. (2007). Effect of phosphorylation and S-S bond-induced dimerization on DNA binding and transcriptional activation by C/EBPbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1800-1804.
- Kim, T.S., and Braciale, T.J. (2009). Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8+ T cell responses. *PLoS One* 4, e4204.
- King, C., Ilic, A., Koelsch, K., and Sarvetnick, N. (2004). Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell* 117, 265-277.
- Kita-Furuyama, M., Nagayama, Y., Pichurin, P., McLachlan, S.M., Rapoport, B., and Eguchi, K. (2003). Dendritic cells infected with adenovirus expressing the thyrotrophin receptor induce Graves' hyperthyroidism in BALB/c mice. *Clin Exp Immunol* 131, 234-240.

- Kitamura, D., Roes, J., Kuhn, R., and Rajewsky, K. (1991). A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350, 423-426.
- Kleijmeer, M.J., Ossevoort, M.A., van Veen, C.J., van Hellemond, J.J., Neefjes, J.J., Kast, W.M., Melief, C.J., and Geuze, H.J. (1995). MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. *J Immunol* 154, 5715-5724.
- Kleinewietfeld, M., Manzel, A., Titze, J., Kvakan, H., Yosef, N., Linker, R.A., Muller, D.N., and Hafler, D.A. (2013). Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic T17 cells. *Nature*.
- Knip, M., Virtanen, S.M., Becker, D., Dupre, J., Krischer, J.P., and Akerblom, H.K. (2011). Early feeding and risk of type 1 diabetes: experiences from the Trial to Reduce Insulin-dependent diabetes mellitus in the Genetically at Risk (TRIGR). *Am J Clin Nutr* 94, 1814S-1820S.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27, 485-517.
- Krakovski, M., and Owens, T. (1996). Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 26, 1641-1646.
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Jaeckel, E., Khazaie, K., and von Boehmer, H. (2006a). Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunol Rev* 212, 163-169.
- Kretschmer, K., Heng, T.S., and von Boehmer, H. (2006b). De novo production of antigen-specific suppressor cells in vivo. *Nat Protoc* 1, 653-661.
- Kriehuber, E., Bauer, W., Charbonnier, A.S., Winter, D., Amatschek, S., Tamandl, D., Schweifer, N., Stingl, G., and Maurer, D. (2005). Balance between NF-kappaB and JNK/AP-1 activity controls dendritic cell life and death. *Blood* 106, 175-183.
- Kronin, V., Winkel, K., Suss, G., Kelso, A., Heath, W., Kirberg, J., von Boehmer, H., and Shortman, K. (1996). A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production. *J Immunol* 157, 3819-3827.
- Kuchroo, V.K., Anderson, A.C., Waldner, H., Munder, M., Bettelli, E., and Nicholson, L.B. (2002). T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 20, 101-123.
- Kukreja, A., Cost, G., Marker, J., Zhang, C., Sun, Z., Lin-Su, K., Ten, S., Sanz, M., Exley, M., Wilson, B., *et al.* (2002). Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 109, 131-140.
- Lacy, P.E., Davie, J.M., and Finke, E.H. (1979). Prolongation of islet allograft survival following in vitro culture (24 degrees C) and a single injection of ALS. *Science* 204, 312-313.

- Lan, R.Y., Ansari, A.A., Lian, Z.X., and Gershwin, M.E. (2005). Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 4, 351-363.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., and McKnight, S.L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759-1764.
- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 1, 311-316.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201, 233-240.
- Laouar, Y., Welte, T., Fu, X.Y., and Flavell, R.A. (2003). STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation. *Immunity* 19, 903-912.
- Larabee, J.L., Maldonado-Arocho, F.J., Pacheco, S., France, B., DeGiusti, K., Shakir, S.M., Bradley, K.A., and Ballard, J.D. (2011). Glycogen synthase kinase 3 activation is important for anthrax edema toxin-induced dendritic cell maturation and anthrax toxin receptor 2 expression in macrophages. *Infect Immun* 79, 3302-3308.
- Latchman, Y.E., Liang, S.C., Wu, Y., Chernova, T., Sobel, R.A., Klemm, M., Kuchroo, V.K., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2004). PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10691-10696.
- Lawson, J.M., Tremble, J., Dayan, C., Beyan, H., Leslie, R.D., Peakman, M., and Tree, T.I. (2008). Increased resistance to CD4+CD25hi regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 154, 353-359.
- LeClair, K.P., Blonar, M.A., and Sharp, P.A. (1992). The p50 subunit of NF-kappa B associates with the NF-IL6 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8145-8149.
- Lee, M., Kim, A.Y., and Kang, Y. (2000). Defects in the differentiation and function of bone marrow-derived dendritic cells in non-obese diabetic mice. *J Korean Med Sci* 15, 217-223.
- Leenen, P.J., Radosevic, K., Voerman, J.S., Salomon, B., van Rooijen, N., Klatzmann, D., and van Ewijk, W. (1998). Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J Immunol* 160, 2166-2173.
- Lekstrom-Himes, J.A. (2001). The role of C/EBP(epsilon) in the terminal stages of granulocyte differentiation. *Stem Cells* 19, 125-133.
- Li, M., Zhang, X., Zheng, X., Lian, D., Zhang, Z.X., Ge, W., Yang, J., Vladau, C., Suzuki, M., Chen, D., *et al.* (2007). Immune modulation and tolerance induction by RelB-silenced dendritic cells through RNA interference. *J Immunol* 178, 5480-5487.

- Li, Q., and McDevitt, H.O. (2011). The role of interferon alpha in initiation of type I diabetes in the NOD mouse. *Clin Immunol* 140, 3-7.
- Li, Q., Xu, B., Michie, S.A., Rubins, K.H., Schreiber, R.D., and McDevitt, H.O. (2008). Interferon-alpha initiates type I diabetes in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12439-12444.
- Li, Z., Jiang, H., Xie, W., Zhang, Z., Smrcka, A.V., and Wu, D. (2000). Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* 287, 1046-1049.
- Liu, S.M., Lee, D.H., Sullivan, J.M., Chung, D., Jager, A., Shum, B.O., Sarvetnick, N.E., Anderson, A.C., and Kuchroo, V.K. (2011). Differential IL-21 signaling in APCs leads to disparate Th17 differentiation in diabetes-susceptible NOD and diabetes-resistant NOD.Idd3 mice. *J Clin Invest* 121, 4303-4310.
- Liu, Y.J. (2005). IPC: professional type I interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23, 275-306.
- Liu, Y.W., Tseng, H.P., Chen, L.C., Chen, B.K., and Chang, W.C. (2003). Functional cooperation of simian virus 40 promoter factor 1 and CCAAT/enhancer-binding protein beta and delta in lipopolysaccharide-induced gene activation of IL-10 in mouse macrophages. *J Immunol* 171, 821-828.
- Long, F., Schipani, E., Asahara, H., Kronenberg, H., and Montminy, M. (2001). The CREB family of activators is required for endochondral bone development. *Development* 128, 541-550.
- Long, S.A., Cerosaletti, K., Bollyky, P.L., Tatum, M., Shilling, H., Zhang, S., Zhang, Z.Y., Pihoker, C., Sanda, S., Greenbaum, C., *et al.* (2010). Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects. *Diabetes* 59, 407-415.
- Loscher, C.E., Draper, E., Leavy, O., Kelleher, D., Mills, K.H., and Roche, H.M. (2005). Conjugated linoleic acid suppresses NF-kappa B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction. *J Immunol* 175, 4990-4998.
- Lu, H.T., Yang, D.D., Wysk, M., Gatti, E., Mellman, I., Davis, R.J., and Flavell, R.A. (1999). Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *Embo J* 18, 1845-1857.
- Lu, J., Zhao, J., Liu, K., Yang, H., Huang, Y., Qin, Z., Bai, R., Li, P., Ma, J., Yan, W., *et al.* (2010). MAPK/ERK1/2 signaling mediates endothelial-like differentiation of immature DCs in the microenvironment of esophageal squamous cell carcinoma. *Cell Mol Life Sci* 67, 2091-2106.
- Ludewig, B., Odermatt, B., Landmann, S., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (1998). Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue. *J Exp Med* 188, 1493-1501.

- Luft, T., Maraskovsky, E., Schnurr, M., Knebel, K., Kirsch, M., Gerner, M., Skoda, R., Ho, A.D., Nawroth, P., and Bierhaus, A. (2004). Tuning the volume of the immune response: strength and persistence of stimulation determine migration and cytokine secretion of dendritic cells. *Blood* 104, 1066-1074.
- Lupardus, P.J., and Garcia, K.C. (2008). The structure of interleukin-23 reveals the molecular basis of p40 subunit sharing with interleukin-12. *J Mol Biol* 382, 931-941.
- Lutz, M.B., and Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 23, 445-449.
- Lutz, M.B., Suri, R.M., Niimi, M., Ogilvie, A.L., Kukutsch, N.A., Rossner, S., Schuler, G., and Austyn, J.M. (2000). Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol* 30, 1813-1822.
- Ma, L., Qian, S., Liang, X., Wang, L., Woodward, J.E., Giannoukakis, N., Robbins, P.D., Bertera, S., Trucco, M., Fung, J.J., *et al.* (2003). Prevention of diabetes in NOD mice by administration of dendritic cells deficient in nuclear transcription factor-kappaB activity. *Diabetes* 52, 1976-1985.
- Mahnke, K., Qian, Y., Knop, J., and Enk, A.H. (2003). Induction of CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood* 101, 4862-4869.
- Maier, U., Babich, A., and Nurnberg, B. (1999). Roles of non-catalytic subunits in gbetagamma-induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma. *J Biol Chem* 274, 29311-29317.
- Maldonado, R.A., and von Andrian, U.H. (2010). How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol* 108, 111-165.
- Maraskovsky, E., Brasel, K., Teepe, M., Roux, E.R., Lyman, S.D., Shortman, K., and McKenna, H.J. (1996). Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 184, 1953-1962.
- Martin, E., O'Sullivan, B., Low, P., and Thomas, R. (2003). Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *Immunity* 18, 155-167.
- Martin, M., Rehani, K., Jope, R.S., and Michalek, S.M. (2005). Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol* 6, 777-784.
- Martin-Orozco, N., Chung, Y., Chang, S.H., Wang, Y.H., and Dong, C. (2009). Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *Eur J Immunol* 39, 216-224.

- Mathis, D., Vence, L., and Benoist, C. (2001). beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature* 414, 792-798.
- Mathur, R.K., Awasthi, A., Wadhwa, P., Ramanamurthy, B., and Saha, B. (2004). Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. *Nat Med* 10, 540-544.
- Matteoli, G., Mazzini, E., Iliev, I.D., Mileti, E., Fallarino, F., Puccetti, P., Chieppa, M., and Rescigno, M. (2010). Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut* 59, 595-604.
- Mattner, F., Fischer, S., Guckes, S., Jin, S., Kaulen, H., Schmitt, E., Rude, E., and Germann, T. (1993). The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. *Eur J Immunol* 23, 2202-2208.
- Matzinger, P., and Guerder, S. (1989). Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? *Nature* 338, 74-76.
- Mayr, B., and Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 599-609.
- Mazzoni, A., and Segal, D.M. (2004). Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J Leukoc Biol* 75, 721-730.
- McClymont, S.A., Putnam, A.L., Lee, M.R., Esensten, J.H., Liu, W., Hulme, M.A., Hoffmuller, U., Baron, U., Olek, S., Bluestone, J.A., *et al.* (2011). Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes. *J Immunol* 186, 3918-3926.
- McColl, S.R. (2002). Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance. *Immunol Cell Biol* 80, 489-496.
- McGeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., McClanahan, T., and Cua, D.J. (2007). TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 8, 1390-1397.
- McGuire, H.M., Vogelzang, A., Hill, N., Flodstrom-Tullberg, M., Sprent, J., and King, C. (2009). Loss of parity between IL-2 and IL-21 in the NOD Idd3 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19438-19443.
- McGuire, H.M., Walters, S., Vogelzang, A., Lee, C.M., Webster, K.E., Sprent, J., Christ, D., Grey, S., and King, C. (2011). Interleukin-21 is critically required in autoimmune and allogeneic responses to islet tissue in murine models. *Diabetes* 60, 867-875.
- McHugh, R.S., Whitters, M.J., Piccirillo, C.A., Young, D.A., Shevach, E.M., Collins, M., and Byrne, M.C. (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16, 311-323.

McIlroy, D., Tanguy-Royer, S., Le Meur, N., Guisle, I., Royer, P.J., Leger, J., Meflah, K., and Gregoire, M. (2005). Profiling dendritic cell maturation with dedicated microarrays. *J Leukoc Biol* 78, 794-803.

Mellet M, Atzei P, Jackson R, O'Neill LA, Moynagh PN. (2011). Mal mediates TLR-induced activation of CREB and expression of IL-10. *J Immunol* 186:4925-35.

Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Li, J., Young, D.B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., *et al.* (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 278, 860-866.

Miossec, P., and Kolls, J.K. (2012). Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 11, 763-776.

Miyazaki, A., Hanafusa, T., Yamada, K., Miyagawa, J., Fujino-Kurihara, H., Nakajima, H., Nonaka, K., and Tarui, S. (1985). Predominance of T lymphocytes in pancreatic islets and spleen of pre-diabetic non-obese diabetic (NOD) mice: a longitudinal study. *Clin Exp Immunol* 60, 622-630.

Mollah, Z.U., Pai, S., Moore, C., O'Sullivan, B.J., Harrison, M.J., Peng, J., Phillips, K., Prins, J.B., Cardinal, J., and Thomas, R. (2008). Abnormal NF-kappa B function characterizes human type 1 diabetes dendritic cells and monocytes. *J Immunol* 180, 3166-3175.

Montminy, M.R., Sevarino, K.A., Wagner, J.A., Mandel, G., and Goodman, R.H. (1986). Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6682-6686.

Morelli, A.E., and Thomson, A.W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 7, 610-621.

Morton, S., Davis, R.J., McLaren, A., and Cohen, P. (2003). A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *Embo J* 22, 3876-3886.

Municio, C., Hugo, E., Alvarez, Y., Alonso, S., Blanco, L., Fernandez, N., and Sanchez Crespo, M. (2011). Apoptotic cells enhance IL-10 and reduce IL-23 production in human dendritic cells treated with zymosan. *Mol Immunol* 49, 97-106.

Nagata, M., Santamaria, P., Kawamura, T., Utsugi, T., and Yoon, J.W. (1994). Evidence for the role of CD8+ cytotoxic T cells in the destruction of pancreatic beta-cells in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 152, 2042-2050.

Nerlov, C. (2008). C/EBPs: recipients of extracellular signals through proteome modulation. *Curr Opin Cell Biol* 20, 180-185.

Nerlov, C., and Ziff, E.B. (1994). Three levels of functional interaction determine the activity of CCAAT/enhancer binding protein-alpha on the serum albumin promoter. *Genes Dev* 8, 350-362.

- Newhook, L.A., Grant, M., Sloka, S., Hoque, M., Paterson, A.D., Hagerty, D., and Curtis, J. (2008). Very high and increasing incidence of type 1 diabetes mellitus in Newfoundland and Labrador, Canada. *Pediatr Diabetes* 9, 62-68.
- Niehof, M., Manns, M.P., and Trautwein, C. (1997). CREB controls LAP/C/EBP beta transcription. *Mol Cell Biol* 17, 3600-3613.
- Niemand, C., Nimmesgern, A., Haan, S., Fischer, P., Schaper, F., Rossaint, R., Heinrich, P.C., and Muller-Newen, G. (2003). Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol* 170, 3263-3272.
- Nikolic, T., Bouma, G., Drexhage, H.A., and Leenen, P.J. (2005). Diabetes-prone NOD mice show an expanded subpopulation of mature circulating monocytes, which preferentially develop into macrophage-like cells in vitro. *J Leukoc Biol* 78, 70-79.
- Nikolic, T., Bunk, M., Drexhage, H.A., and Leenen, P.J. (2004). Bone marrow precursors of nonobese diabetic mice develop into defective macrophage-like dendritic cells in vitro. *J Immunol* 173, 4342-4351.
- Nikoopour, E., Sandrock, C., Huszarik, K., Krougly, O., Lee-Chan, E., Masteller, E.L., Bluestone, J.A., and Singh, B. (2011). Cutting edge: vasostatin-1-derived peptide ChgA29-42 is an antigenic epitope of diabetogenic BDC2.5 T cells in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 186, 3831-3835.
- Novak, N., Siepmann, K., Zierhut, M., and Bieber, T. (2003). The good, the bad and the ugly--APCs of the eye. *Trends Immunol* 24, 570-574.
- Ochando, J.C., Homma, C., Yang, Y., Hidalgo, A., Garin, A., Tacke, F., Angeli, V., Li, Y., Boros, P., Ding, Y., *et al.* (2006). Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 7, 652-662.
- Ohnmacht, C., Pullner, A., King, S.B., Drexler, I., Meier, S., Brocker, T., and Voehringer, D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med* 206, 549-559.
- Ohtani, M., Nagai, S., Kondo, S., Mizuno, S., Nakamura, K., Tanabe, M., Takeuchi, T., Matsuda, S., and Koyasu, S. (2008). Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. *Blood* 112, 635-643.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., *et al.* (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13, 715-725.
- Ouaaz, F., Arron, J., Zheng, Y., Choi, Y., and Beg, A.A. (2002). Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity* 16, 257-270.

- Palmer, J.P., Asplin, C.M., Clemons, P., Lyen, K., Tatpati, O., Raghu, P.K., and Paquette, T.L. (1983). Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 222, 1337-1339.
- Park, J.M., Greten, F.R., Wong, A., Westrick, R.J., Arthur, J.S., Otsu, K., Hoffmann, A., Montminy, M., and Karin, M. (2005). Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis--CREB and NF-kappaB as key regulators. *Immunity* 23, 319-329.
- Park, W.R., Nakahira, M., Sugimoto, N., Bian, Y., Yashiro-Ohtani, Y., Zhou, X.Y., Yang, Y.F., Hamaoka, T., and Fujiwara, H. (2004). A mechanism underlying STAT4-mediated up-regulation of IFN-gamma induction in TCR-triggered T cells. *Int Immunol* 16, 295-302.
- Pathak, S.K., Skold, A.E., Mohanram, V., Persson, C., Johansson, U., and Spetz, A.L. (2012). Activated apoptotic cells induce dendritic cell maturation via engagement of Toll-like receptor 4 (TLR4), dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN), and beta2 integrins. *J Biol Chem* 287, 13731-13742.
- Pearson, T., Markees, T.G., Serreze, D.V., Pierce, M.A., Marron, M.P., Wicker, L.S., Peterson, L.B., Shultz, L.D., Mordes, J.P., Rossini, A.A., *et al.* (2003). Genetic disassociation of autoimmunity and resistance to costimulation blockade-induced transplantation tolerance in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 171, 185-195.
- Pelayo, R., Hirose, J., Huang, J., Garrett, K.P., Delogu, A., Busslinger, M., and Kincade, P.W. (2005). Derivation of 2 categories of plasmacytoid dendritic cells in murine bone marrow. *Blood* 105, 4407-4415.
- Pelletier, A.N., Guimont-Desrochers, F., Ashton, M.P., Brodnicki, T.C., and Lesage, S. (2012). The size of the plasmacytoid dendritic cell compartment is a multigenic trait dominated by a locus on mouse chromosome 7. *J Immunol* 188, 5561-5570.
- Penna, G., Amuchastegui, S., Giarratana, N., Daniel, K.C., Vulcano, M., Sozzani, S., and Adorini, L. (2007). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 178, 145-153.
- Pierre, P., Turley, S.J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R.M., and Mellman, I. (1997). Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388, 787-792.
- Pilz, A., Kratky, W., Stockinger, S., Simma, O., Kalinke, U., Lingnau, K., von Gabain, A., Stoiber, D., Sexl, V., Kolbe, T., *et al.* (2009). Dendritic cells require STAT-1 phosphorylated at its transactivating domain for the induction of peptide-specific CTL. *J Immunol* 183, 2286-2293.
- Piwiien-Pilipuk, G., MacDougald, O., and Schwartz, J. (2002). Dual regulation of phosphorylation and dephosphorylation of C/EBPbeta modulate its transcriptional activation and DNA binding in response to growth hormone. *J Biol Chem* 277, 44557-44565.
- Platzer, B., Jorgl, A., Taschner, S., Hocher, B., and Strobl, H. (2004). RelB regulates human dendritic cell subset development by promoting monocyte intermediates. *Blood* 104, 3655-3663.

- Platzer, C., Fritsch, E., Elsner, T., Lehmann, M.H., Volk, H.D., and Prosch, S. (1999). Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. *Eur J Immunol* 29, 3098-3104.
- Plevy, S.E., Gemberling, J.H., Hsu, S., Dorner, A.J., and Smale, S.T. (1997). Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins. *Mol Cell Biol* 17, 4572-4588.
- Poli, V. (1998). The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem* 273, 29279-29282.
- Poligone, B., Weaver, D.J., Jr., Sen, P., Baldwin, A.S., Jr., and Tisch, R. (2002). Elevated NF-kappaB activation in nonobese diabetic mouse dendritic cells results in enhanced APC function. *J Immunol* 168, 188-196.
- Poncini, C.V., Gimenez, G., Pontillo, C.A., Alba-Soto, C.D., de Isola, E.L., Piazzon, I., and Cappa, S.M. (2010). Central role of extracellular signal-regulated kinase and Toll-like receptor 4 in IL-10 production in regulatory dendritic cells induced by *Trypanosoma cruzi*. *Mol Immunol* 47, 1981-1988.
- Puig-Kroger, A., Relloso, M., Fernandez-Capetillo, O., Zubiaga, A., Silva, A., Bernabeu, C., and Corbi, A.L. (2001). Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* 98, 2175-2182.
- Pulendran, B., Lingappa, J., Kennedy, M.K., Smith, J., Teepe, M., Rudensky, A., Maliszewski, C.R., and Maraskovsky, E. (1997). Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J Immunol* 159, 2222-2231.
- Puri, K.D., Doggett, T.A., Douangpanya, J., Hou, Y., Tino, W.T., Wilson, T., Graf, T., Clayton, E., Turner, M., Hayflick, J.S., *et al.* (2004). Mechanisms and implications of phosphoinositide 3-kinase delta in promoting neutrophil trafficking into inflamed tissue. *Blood* 103, 3448-3456.
- Puri, K.D., Doggett, T.A., Huang, C.Y., Douangpanya, J., Hayflick, J.S., Turner, M., Penninger, J., and Diacovo, T.G. (2005). The role of endothelial PI3Kgamma activity in neutrophil trafficking. *Blood* 106, 150-157.
- Qian, C., Jiang, X., An, H., Yu, Y., Guo, Z., Liu, S., Xu, H., and Cao, X. (2006). TLR agonists promote ERK-mediated preferential IL-10 production of regulatory dendritic cells (diffDCs), leading to NK-cell activation. *Blood* 108, 2307-2315.
- Raivich, G. (2008). c-Jun expression, activation and function in neural cell death, inflammation and repair. *J Neurochem* 107, 898-906.
- Ramji, D.P., and Foka, P. (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365, 561-575.

Re, F., and Strominger, J.L. (2004). Heterogeneity of TLR-induced responses in dendritic cells: from innate to adaptive immunity. *Immunobiology* 209, 191-198.

Regnier, C.H., Song, H.Y., Gao, X., Goeddel, D.V., Cao, Z., and Rothe, M. (1997). Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 90, 373-383.

Remoli, M.E., Ragimbeau, J., Giacomini, E., Gafa, V., Severa, M., Lande, R., Pellegrini, S., and Coccia, E.M. (2007). NF- κ B is required for STAT-4 expression during dendritic cell maturation. *J Leukoc Biol* 81, 355-363.

Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C.L., Gold, M.R., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1998). Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* 188, 2175-2180.

Ridgway, W.M., and Fathman, C.G. (1999). MHC structure and autoimmune T cell repertoire development. *Curr Opin Immunol* 11, 638-642.

Rizzitelli, A., Hawkins, E., Todd, H., Hodgkin, P.D., and Shortman, K. (2006). The proliferative response of CD4 T cells to steady-state CD8⁺ dendritic cells is restricted by post-activation death. *Int Immunol* 18, 415-423.

Rodionova, E., Conzelmann, M., Maraskovsky, E., Hess, M., Kirsch, M., Giese, T., Ho, A.D., Zoller, M., Dreger, P., and Luft, T. (2007). GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells. *Blood* 109, 1584-1592.

Roux, P.P., and Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 320-344.

Rudolph, D., Tafuri, A., Gass, P., Hammerling, G.J., Arnold, B., and Schutz, G. (1998). Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4481-4486.

Ruffell, D., Mourkioti, F., Gambardella, A., Kirstetter, P., Lopez, R.G., Rosenthal, N., and Nerlov, C. (2009). A CREB-C/EBP β cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17475-17480.

Rutella, S., Bonanno, G., Pierelli, L., Mariotti, A., Capoluongo, E., Contemi, A.M., Ameglio, F., Curti, A., De Ritis, D.G., Voso, M.T., *et al.* (2004). Granulocyte colony-stimulating factor promotes the generation of regulatory DC through induction of IL-10 and IFN- α . *Eur J Immunol* 34, 1291-1302.

Rutella, S., Bonanno, G., Procoli, A., Mariotti, A., de Ritis, D.G., Curti, A., Danese, S., Pessina, G., Pandolfi, S., Natoni, F., *et al.* (2006a). Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10⁺⁺IL-12^{low/neg} accessory cells with dendritic-cell features. *Blood* 108, 218-227.

Rutella, S., Danese, S., and Leone, G. (2006b). Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 108, 1435-1440.

- Ryba-Stanislawowska, M., Skrzypkowska, M., Mysliwiec, M., and Mysliwska, J. (2013). Loss of the balance between CD4Foxp3 regulatory T cells and CD4IL17A Th17 cells in patients with type 1 diabetes. *Hum Immunol*.
- Sadhu, C., Dick, K., Tino, W.T., and Staunton, D.E. (2003a). Selective role of PI3K delta in neutrophil inflammatory responses. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 764-769.
- Sadhu, C., Masinovsky, B., Dick, K., Sowell, C.G., and Staunton, D.E. (2003b). Essential role of phosphoinositide 3-kinase delta in neutrophil directional movement. *J Immunol* 170, 2647-2654.
- Salter, R.D., and Watkins, S.C. (2009). Dendritic cell altered states: what role for calcium? *Immunol Rev* 231, 278-288.
- Saraiva, M., and O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 10, 170-181.
- Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Jones, R.G., Oliveira-dos-Santos, A.J., Stanford, W.L., Bolon, B., Wakeham, A., Itie, A., Bouchard, D., Kozieradzki, I., *et al.* (2000). Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* 287, 1040-1046.
- Sato, K., Nagayama, H., Tadokoro, K., Juji, T., and Takahashi, T.A. (1999). Extracellular signal-regulated kinase, stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, and p38mapk are involved in IL-10-mediated selective repression of TNF-alpha-induced activation and maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 162, 3865-3872.
- Sato, K., Yamashita, N., and Matsuyama, T. (2002). Human peripheral blood monocyte-derived interleukin-10-induced semi-mature dendritic cells induce anergic CD4(+) and CD8(+) T cells via presentation of the internalized soluble antigen and cross-presentation of the phagocytosed necrotic cellular fragments. *Cell Immunol* 215, 186-194.
- Satpathy, A.T., Wumesh, K.C., Albring, J.C., Edelson, B.T., Kretzer, N.M., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2012). Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J Exp Med* 209, 1135-1152.
- Saunders, D., Lucas, K., Ismaili, J., Wu, L., Maraskovsky, E., Dunn, A., and Shortman, K. (1996). Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 184, 2185-2196.
- Scheicher, C., Mehlig, M., Zecher, R., and Reske, K. (1992). Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol Methods* 154, 253-264.
- Schiavoni, G., Mattei, F., Borghi, P., Sestili, P., Venditti, M., Morse, H.C., 3rd, Belardelli, F., and Gabriele, L. (2004). ICSBP is critically involved in the normal development and trafficking of Langerhans cells and dermal dendritic cells. *Blood* 103, 2221-2228.
- Schiavoni, G., Mattei, F., Sestili, P., Borghi, P., Venditti, M., Morse, H.C., 3rd, Belardelli, F., and Gabriele, L. (2002). ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing

cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells. *J Exp Med* 196, 1415-1425.

Schneider, A., Rieck, M., Sanda, S., Pihoker, C., Greenbaum, C., and Buckner, J.H. (2008). The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4+ FOXP3+ regulatory T cells. *J Immunol* 181, 7350-7355.

Schwab, N., Zozulya, A.L., Kieseier, B.C., Toyka, K.V., and Wiendl, H. (2010). An imbalance of two functionally and phenotypically different subsets of plasmacytoid dendritic cells characterizes the dysfunctional immune regulation in multiple sclerosis. *J Immunol* 184, 5368-5374.

Screpanti, I., Romani, L., Musiani, P., Modesti, A., Fattori, E., Lazzaro, D., Sellitto, C., Scarpa, S., Bellavia, D., Lattanzio, G., *et al.* (1995). Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. *Embo J* 14, 1932-1941.

Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C., *et al.* (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293, 1495-1499.

Serreze, D.V., Chapman, H.D., Varnum, D.S., Gerling, I., Leiter, E.H., and Shultz, L.D. (1997). Initiation of autoimmune diabetes in NOD/Lt mice is MHC class I-dependent. *J Immunol* 158, 3978-3986.

Serreze, D.V., Chapman, H.D., Varnum, D.S., Hanson, M.S., Reifsnnyder, P.C., Richard, S.D., Fleming, S.A., Leiter, E.H., and Shultz, L.D. (1996). B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig mu null mice. *J Exp Med* 184, 2049-2053.

Serreze, D.V., Fleming, S.A., Chapman, H.D., Richard, S.D., Leiter, E.H., and Tisch, R.M. (1998). B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 161, 3912-3918.

Serreze, D.V., Leiter, E.H., Christianson, G.J., Greiner, D., and Roopenian, D.C. (1994). Major histocompatibility complex class I-deficient NOD-B2mnull mice are diabetes and insulinitis resistant. *Diabetes* 43, 505-509.

Shao, S., He, F., Yang, Y., Yuan, G., Zhang, M., and Yu, X. (2012). Th17 cells in type 1 diabetes. *Cell Immunol* 280, 16-21.

Shi, D., Xiao, X., Wang, J., Liu, L., Chen, W., Fu, L., Xie, F., Huang, W., and Deng, W. (2012). Melatonin suppresses proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated CRL1999 cells via targeting MAPK, NF-kappaB, c/EBPbeta, and p300 signaling. *J Pineal Res* 53, 154-165.

Shigematsu, H., Reizis, B., Iwasaki, H., Mizuno, S., Hu, D., Traver, D., Leder, P., Sakaguchi, N., and Akashi, K. (2004). Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity* 21, 43-53.

- Shih, V.F., Davis-Turak, J., Macal, M., Huang, J.Q., Ponomarenko, J., Kearns, J.D., Yu, T., Fagerlund, R., Asagiri, M., Zuniga, E.I., *et al.* (2012). Control of RelB during dendritic cell activation integrates canonical and noncanonical NF-kappaB pathways. *Nat Immunol* 13, 1162-1170.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3, 135-142.
- Shizuru, J.A., and Fathman, C.G. (1993). Anti-CD4 antibodies in diabetes. *Immunol Ser* 59, 237-252.
- Shizuru, J.A., Taylor-Edwards, C., Banks, B.A., Gregory, A.K., and Fathman, C.G. (1988). Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. *Science* 240, 659-662.
- Short, J.M., Wynshaw-Boris, A., Short, H.P., and Hanson, R.W. (1986). Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) promoter-regulatory region. II. Identification of cAMP and glucocorticoid regulatory domains. *J Biol Chem* 261, 9721-9726.
- Shortman, K., and Heath, W.R. (2010). The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol Rev* 234, 18-31.
- Sica, A., Dorman, L., Viggiano, V., Cippitelli, M., Ghosh, P., Rice, N., and Young, H.A. (1997). Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *J Biol Chem* 272, 30412-30420.
- Siddiqui, K.R., and Powrie, F. (2008). CD103+ GALT DCs promote Foxp3+ regulatory T cells. *Mucosal Immunol* 1 Suppl 1, S34-38.
- Smink, J.J., and Leutz, A. (2010). Rapamycin and the transcription factor C/EBPbeta as a switch in osteoclast differentiation: implications for lytic bone diseases. *J Mol Med (Berl)* 88, 227-233.
- Smith, C.M., Belz, G.T., Wilson, N.S., Villadangos, J.A., Shortman, K., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2003). Cutting edge: conventional CD8 alpha+ dendritic cells are preferentially involved in CTL priming after footpad infection with herpes simplex virus-1. *J Immunol* 170, 4437-4440.
- Solan, N.J., Miyoshi, H., Carmona, E.M., Bren, G.D., and Paya, C.V. (2002). RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J Biol Chem* 277, 1405-1418.
- Solimena, M., Dirkx, R., Jr., Hermel, J.M., Pleasic-Williams, S., Shapiro, J.A., Caron, L., and Rabin, D.U. (1996). ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. *Embo J* 15, 2102-2114.
- Solomon, M., and Sarvetnick, N. (2004). The pathogenesis of diabetes in the NOD mouse. *Adv Immunol* 84, 239-264.

- Spolski, R., Kashyap, M., Robinson, C., Yu, Z., and Leonard, W.J. (2008). IL-21 signaling is critical for the development of type I diabetes in the NOD mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 14028-14033.
- Stein, B., Cogswell, P.C., and Baldwin, A.S., Jr. (1993). Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. *Mol Cell Biol* *13*, 3964-3974.
- Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J., and Enk, A.H. (2002). CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* *99*, 2468-2476.
- Steinbrink, K., Wolfl, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A.H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* *159*, 4772-4780.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* *137*, 1142-1162.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* *21*, 685-711.
- Steinman, R.M., Turley, S., Mellman, I., and Inaba, K. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* *191*, 411-416.
- Stephens, R.J., Ritchie, J.M., and Harrison, L.C. (2002). Increased generation of dendritic cells from myeloid progenitors in autoimmune-prone nonobese diabetic mice. *J Immunol* *168*, 5032-5041.
- Stewart, T.A., Hultgren, B., Huang, X., Pitts-Meek, S., Hully, J., and MacLachlan, N.J. (1993). Induction of type I diabetes by interferon-alpha in transgenic mice. *Science* *260*, 1942-1946.
- Strid, J., Lopes, L., Marcinkiewicz, J., Petrovska, L., Nowak, B., Chain, B.M., and Lund, T. (2001). A defect in bone marrow derived dendritic cell maturation in the nonobese diabetic mouse. *Clin Exp Immunol* *123*, 375-381.
- Sugihara, S., Ogata, T., Kawamura, T., Urakami, T., Takemoto, K., Kikuchi, N., Takubo, N., Tsubouchi, K., Horikawa, R., Kobayashi, K., *et al.* (2012). HLA-class II and class I genotypes among Japanese children with Type 1A diabetes and their families. *Pediatr Diabetes* *13*, 33-44.
- Suire, S., Coadwell, J., Ferguson, G.J., Davidson, K., Hawkins, P., and Stephens, L. (2005). p84, a new Gbetagamma-activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110gamma. *Curr Biol* *15*, 566-570.
- Suzuki, S., Honma, K., Matsuyama, T., Suzuki, K., Toriyama, K., Akitoyo, I., Yamamoto, K., Suematsu, T., Nakamura, M., Yui, K., *et al.* (2004). Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11bhighCD8alpha- dendritic cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 8981-8986.

- Swai, A.B., McLarty, D.G., and Alberti, K.G. (1993). IDDM in sub-Saharan Africa. *Diabet Med* 10, 188.
- Swiecki, M., and Colonna, M. (2010). Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol Rev* 234, 142-162.
- Tacke, R.S., Tosello-Tramont, A., Nguyen, V., Mullins, D.W., and Hahn, Y.S. (2011). Extracellular hepatitis C virus core protein activates STAT3 in human monocytes/macrophages/dendritic cells via an IL-6 autocrine pathway. *J Biol Chem* 286, 10847-10855.
- Taieb, A., Breiting, J.J., Unadkat, J.V., Shufesky, W.J., Morelli, A.E., Thomson, A.W., Lee, W.P., and Feili-Hariri, M. (2007). Intrinsic ability of GM+IL-4 but not Flt3L-induced rat dendritic cells to promote allogeneic T cell hyporesponsiveness. *Clin Immunol* 123, 176-189.
- Takeda, K., Clausen, B.E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Forster, I., and Akira, S. (1999). Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 10, 39-49.
- Tanaka, N., Hoshino, Y., Gold, J., Hoshino, S., Martiniuk, F., Kurata, T., Pine, R., Levy, D., Rom, W.N., and Weiden, M. (2005). Interleukin-10 induces inhibitory C/EBP β through STAT-3 and represses HIV-1 transcription in macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33, 406-411.
- Tanaka, T., Akira, S., Yoshida, K., Umemoto, M., Yoneda, Y., Shirafuji, N., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., and Kishimoto, T. (1995). Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell* 80, 353-361.
- Tang, J.G., and Koeffler, H.P. (2001). Structural and functional studies of CCAAT/enhancer-binding protein epsilon. *J Biol Chem* 276, 17739-17746.
- Tang, Q., Adams, J.Y., Penaranda, C., Melli, K., Piaggio, E., Sgouroudis, E., Piccirillo, C.A., Salomon, B.L., and Bluestone, J.A. (2008). Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity* 28, 687-697.
- Tang, Q., Adams, J.Y., Tooley, A.J., Bi, M., Fife, B.T., Serra, P., Santamaria, P., Locksley, R.M., Krummel, M.F., and Bluestone, J.A. (2006). Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol* 7, 83-92.
- Tang, Q.Q., Gronborg, M., Huang, H., Kim, J.W., Otto, T.C., Pandey, A., and Lane, M.D. (2005). Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein β by MAPK and glycogen synthase kinase 3 β is required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9766-9771.
- Thi, E.P., and Reiner, N.E. (2012). Phosphatidylinositol 3-kinases and their roles in phagosome maturation. *J Leukoc Biol* 92, 553-566.

Todd, J.A. (1991). A protective role of the environment in the development of type 1 diabetes? *Diabet Med* 8, 906-910.

Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M.L., Greene, M.I., and Tone, M. (2008). Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol* 9, 194-202.

Tran, D.Q. (2012). TGF-beta: the sword, the wand, and the shield of FOXP3(+) regulatory T cells. *J Mol Cell Biol* 4, 29-37.

Tran, E.H., Prince, E.N., and Owens, T. (2000). IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol* 164, 2759-2768.

Trembleau, S., Penna, G., Bosi, E., Mortara, A., Gately, M.K., and Adorini, L. (1995). Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. *J Exp Med* 181, 817-821.

Turley, S., Poirot, L., Hattori, M., Benoist, C., and Mathis, D. (2003). Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *J Exp Med* 198, 1527-1537.

Ueki, K., Fruman, D.A., Yballe, C.M., Fasshauer, M., Klein, J., Asano, T., Cantley, L.C., and Kahn, C.R. (2003). Positive and negative roles of p85 alpha and p85 beta regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling. *J Biol Chem* 278, 48453-48466.

Ueno, A., Cho, S., Cheng, L., Wang, J., Hou, S., Nakano, H., Santamaria, P., and Yang, Y. (2007). Transient upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by human chorionic gonadotropin downregulates autoimmune diabetes. *Diabetes* 56, 1686-1693.

Vallejo, M., Ron, D., Miller, C.P., and Habener, J.F. (1993). C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4679-4683.

Van Belle, T.L., Nierkens, S., Arens, R., and von Herrath, M.G. (2012). Interleukin-21 receptor-mediated signals control autoreactive T cell infiltration in pancreatic islets. *Immunity* 36, 1060-1072.

van Dijk, T.B., Baltus, B., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Koenderman, L., and de Groot, R.P. (1999). A composite C/EBP binding site is essential for the activity of the promoter of the IL-3/IL-5/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor beta c gene. *J Immunol* 163, 2674-2680.

van Vliet, S.J., den Dunnen, J., Gringhuis, S.I., Geijtenbeek, T.B., and van Kooyk, Y. (2007). Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr Opin Immunol* 19, 435-440.

Vehik, K., and Dabelea, D. (2011). The changing epidemiology of type 1 diabetes: why is it going through the roof? *Diabetes Metab Res Rev* 27, 3-13.

- Vendrame, F., Pileggi, A., Laughlin, E., Allende, G., Martin-Pagola, A., Molano, R.D., Diamantopoulos, S., Standifer, N., Geubtner, K., Falk, B.A., *et al.* (2010). Recurrence of type 1 diabetes after simultaneous pancreas-kidney transplantation, despite immunosuppression, is associated with autoantibodies and pathogenic autoreactive CD4 T-cells. *Diabetes* 59, 947-957.
- Voigt, P., Dorner, M.B., and Schaefer, M. (2006). Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. *J Biol Chem* 281, 9977-9986.
- von Herrath, M.G., Fujinami, R.S., and Whitton, J.L. (2003). Microorganisms and autoimmunity: making the barren field fertile? *Nat Rev Microbiol* 1, 151-157.
- Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 164, 2978-2986.
- Vremec, D., and Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol* 159, 565-573.
- Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D.J., Ardavin, C.F., Wu, L., and Shortman, K. (1992). The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med* 176, 47-58.
- Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breitmayer, J.P., Cottrez, F., and Groux, H. (2003). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18, 605-617.
- Wang, H., Brown, J., Garcia, C.A., Tang, Y., Benakanakere, M.R., Greenway, T., Alard, P., Kinane, D.F., and Martin, M. (2011a). The role of glycogen synthase kinase 3 in regulating IFN-beta-mediated IL-10 production. *J Immunol* 186, 675-684.
- Wang, H., Brown, J., and Martin, M. (2011b). Glycogen synthase kinase 3: a point of convergence for the host inflammatory response. *Cytokine* 53, 130-140.
- Wang, H., Larris, B., Peiris, T.H., Zhang, L., Le Lay, J., Gao, Y., and Greenbaum, L.E. (2007a). C/EBPbeta activates E2F-regulated genes in vivo via recruitment of the coactivator CREB-binding protein/P300. *J Biol Chem* 282, 24679-24688.
- Wang, J., Tsai, S., Shameli, A., Yamanouchi, J., Alkemade, G., and Santamaria, P. (2010). In situ recognition of autoantigen as an essential gatekeeper in autoimmune CD8+ T cell inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 9317-9322.
- Wang, J., Wang, X., Hussain, S., Zheng, Y., Sanjabi, S., Ouaz, F., and Beg, A.A. (2007b). Distinct roles of different NF-kappa B subunits in regulating inflammatory and T cell stimulatory gene expression in dendritic cells. *J Immunol* 178, 6777-6788.

Watanabe, N., Wang, Y.H., Lee, H.K., Ito, T., Cao, W., and Liu, Y.J. (2005a). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436, 1181-1185.

Watanabe, N., Wang, Y.H., Lee, H.K., Ito, T., Wang, Y.H., Cao, W., and Liu, Y.J. (2005b). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436, 1181-1185.

Weaver, D.J., Jr., Poligone, B., Bui, T., Abdel-Motal, U.M., Baldwin, A.S., Jr., and Tisch, R. (2001). Dendritic cells from nonobese diabetic mice exhibit a defect in NF-kappa B regulation due to a hyperactive I kappa B kinase. *J Immunol* 167, 1461-1468.

Wei, L., Laurence, A., Elias, K.M., and O'Shea, J.J. (2007). IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem* 282, 34605-34610.

Wei, L., Vahedi, G., Sun, H.W., Watford, W.T., Takatori, H., Ramos, H.L., Takahashi, H., Liang, J., Gutierrez-Cruz, G., Zang, C., *et al.* (2010). Discrete roles of STAT4 and STAT6 transcription factors in tuning epigenetic modifications and transcription during T helper cell differentiation. *Immunity* 32, 840-851.

Weih, F., Carrasco, D., Durham, S.K., Barton, D.S., Rizzo, C.A., Ryseck, R.P., Lira, S.A., and Bravo, R. (1995). Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell* 80, 331-340.

Welte, T., Koch, F., Schuler, G., Lechner, J., Doppler, W., and Heufler, C. (1997). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces a unique set of STAT factors in murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 27, 2737-2740.

Wen, A.Y., Sakamoto, K.M., and Miller, L.S. (2010). The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol* 185, 6413-6419.

Wen, L., Peng, J., Li, Z., and Wong, F.S. (2004). The effect of innate immunity on autoimmune diabetes and the expression of Toll-like receptors on pancreatic islets. *J Immunol* 172, 3173-3180.

Wen, Z., and Darnell, J.E., Jr. (1997). Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res* 25, 2062-2067.

Wen, Z., Zhong, Z., and Darnell, J.E., Jr. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82, 241-250.

Whitmarsh, A.J., and Davis, R.J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 74, 589-607.

Wicker, L.S., Clark, J., Fraser, H.I., Garner, V.E., Gonzalez-Munoz, A., Healy, B., Howlett, S., Hunter, K., Rainbow, D., Rosa, R.L., *et al.* (2005). Type 1 diabetes genes and pathways shared by humans and NOD mice. *J Autoimmun* 25 Suppl, 29-33.

- Wicker, L.S., Miller, B.J., Coker, L.Z., McNally, S.E., Scott, S., Mullen, Y., and Appel, M.C. (1987). Genetic control of diabetes and insulinitis in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *J Exp Med* 165, 1639-1654.
- Williams, S.C., Baer, M., Dillner, A.J., and Johnson, P.F. (1995). CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *Embo J* 14, 3170-3183.
- Williamson, E.A., Xu, H.N., Gombart, A.F., Verbeek, W., Chumakov, A.M., Friedman, A.D., and Koeffler, H.P. (1998). Identification of transcriptional activation and repression domains in human CCAAT/enhancer-binding protein epsilon. *J Biol Chem* 273, 14796-14804.
- Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V.S., Davoust, J., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* 185, 317-328.
- Wofle, S.J., Strebovsky, J., Bartz, H., Sahr, A., Arnold, C., Kaiser, C., Dalpke, A.H., and Heeg, K. (2011). PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. *Eur J Immunol* 41, 413-424.
- Wong, F.S., Visintin, I., Wen, L., Granata, J., Flavell, R., and Janeway, C.A. (1998). The role of lymphocyte subsets in accelerated diabetes in nonobese diabetic-rat insulin promoter-B7-1 (NOD-RIP-B7-1) mice. *J Exp Med* 187, 1985-1993.
- Wong, J., Mathis, D., and Benoist, C. (2007). TCR-based lineage tracing: no evidence for conversion of conventional into regulatory T cells in response to a natural self-antigen in pancreatic islets. *J Exp Med* 204, 2039-2045.
- Wong, S., Guerder, S., Visintin, I., Reich, E.P., Swenson, K.E., Flavell, R.A., and Janeway, C.A., Jr. (1995). Expression of the co-stimulator molecule B7-1 in pancreatic beta-cells accelerates diabetes in the NOD mouse. *Diabetes* 44, 326-329.
- Woodgett, J.R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *Embo J* 9, 2431-2438.
- Wu, L., D'Amico, A., Winkel, K.D., Suter, M., Lo, D., and Shortman, K. (1998). RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity* 9, 839-847.
- Wu, L., Li, C.L., and Shortman, K. (1996). Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med* 184, 903-911.
- Wu, L., Nichogiannopoulou, A., Shortman, K., and Georgopoulos, K. (1997). Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. *Immunity* 7, 483-492.
- Xiang, Y., Peng, J., Tai, N., Hu, C., Zhou, Z., Wong, F.S., and Wen, L. (2012). The dual effects of B cell depletion on antigen-specific T cells in BDC2.5NOD mice. *J Immunol* 188, 4747-4758.

- Xiao, G., Fong, A., and Sun, S.C. (2004). Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 279, 30099-30105.
- Xiao, G., Harhaj, E.W., and Sun, S.C. (2001). NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* 7, 401-409.
- Xiao, G., Rabson, A.B., Young, W., Qing, G., and Qu, Z. (2006). Alternative pathways of NF-kappaB activation: a double-edged sword in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, 281-293.
- Xie, J., Qian, J., Wang, S., Freeman, M.E., 3rd, Epstein, J., and Yi, Q. (2003). Novel and detrimental effects of lipopolysaccharide on in vitro generation of immature dendritic cells: involvement of mitogen-activated protein kinase p38. *J Immunol* 171, 4792-4800.
- Yamanaka, R., Kim, G.D., Radomska, H.S., Lekstrom-Himes, J., Smith, L.T., Antonson, P., Tenen, D.G., and Xanthopoulos, K.G. (1997). CCAAT/enhancer binding protein epsilon is preferentially up-regulated during granulocytic differentiation and its functional versatility is determined by alternative use of promoters and differential splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6462-6467.
- Yamasaki, M., Kang, H.R., Homer, R.J., Chapoval, S.P., Cho, S.J., Lee, B.J., Elias, J.A., and Lee, C.G. (2008). P21 regulates TGF-beta1-induced pulmonary responses via a TNF-alpha-signaling pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38, 346-353.
- Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Shin, T., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M., Okumura, K., *et al.* (2002). Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* 169, 5538-5545.
- Yan, C., Johnson, P.F., Tang, H., Ye, Y., Wu, M., and Gao, H. (2012). CCAAT/Enhancer-Binding Protein delta Is a Critical Mediator of Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury. *Am J Pathol*.
- Yang, X.O., Panopoulos, A.D., Nurieva, R., Chang, S.H., Wang, D., Watowich, S.S., and Dong, C. (2007). STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 282, 9358-9363.
- Yang, X.O., Pappu, B.P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H.S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A.D., Schluns, K.S., *et al.* (2008). T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 28, 29-39.
- Yang, Y., and Santamaria, P. (2006). Lessons on autoimmune diabetes from animal models. *Clin Sci (Lond)* 110, 627-639.
- Yao, Y., Xu, Q., Kwon, M.J., Matta, R., Liu, Y., Hong, S.C., and Chang, C.H. (2006). ERK and p38 MAPK signaling pathways negatively regulate CIITA gene expression in dendritic cells and macrophages. *J Immunol* 177, 70-76.

- Yen, J.H., Kocieda, V.P., Jing, H., and Ganea, D. (2011). Prostaglandin E2 induces matrix metalloproteinase 9 expression in dendritic cells through two independent signaling pathways leading to activator protein 1 (AP-1) activation. *J Biol Chem* 286, 38913-38923.
- Yi, A.K., Yoon, J.G., Yeo, S.J., Hong, S.C., English, B.K., and Krieg, A.M. (2002). Role of mitogen-activated protein kinases in CpG DNA-mediated IL-10 and IL-12 production: central role of extracellular signal-regulated kinase in the negative feedback loop of the CpG DNA-mediated Th1 response. *J Immunol* 168, 4711-4720.
- Yoshimura, S., Bondeson, J., Brennan, F.M., Foxwell, B.M., and Feldmann, M. (2001). Role of NFkappaB in antigen presentation and development of regulatory T cells elucidated by treatment of dendritic cells with the proteasome inhibitor PSI. *Eur J Immunol* 31, 1883-1893.
- You, S., Chen, C., Lee, W.H., Wu, C.H., Judkowski, V., Pinilla, C., Wilson, D.B., and Liu, C.P. (2003). Detection and characterization of T cells specific for BDC2.5 T cell-stimulating peptides. *J Immunol* 170, 4011-4020.
- Yu, J., Zhang, Y., McIlroy, J., Rordorf-Nikolic, T., Orr, G.A., and Backer, J.M. (1998). Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol* 18, 1379-1387.
- Yu, K., and Gorczynski, R.M. (2012). Persistence of gene expression profile in CD200 transgenic skin allografts is associated with graft survival on retransplantation to normal recipients. *Transplantation* 94, 36-42.
- Yu, Q., Kovacs, C., Yue, F.Y., and Ostrowski, M.A. (2004). The role of the p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase, and phosphoinositide-3-OH kinase signal transduction pathways in CD40 ligand-induced dendritic cell activation and expansion of virus-specific CD8+ T cell memory responses. *J Immunol* 172, 6047-6056.
- Zdrengeha, M.T., and Johnston, S.L. (2012). Role of PD-L1/PD-1 in the immune response to respiratory viral infections. *Microbes Infect* 14, 495-499.
- Zeng, R., Oderup, C., Yuan, R., Lee, M., Habtezion, A., Hadeiba, H., and Butcher, E.C. (2012). Retinoic acid regulates the development of a gut-homing precursor for intestinal dendritic cells. *Mucosal Immunol*.
- Zhang, G.X., Gran, B., Yu, S., Li, J., Siglienti, I., Chen, X., Kamoun, M., and Rostami, A. (2003a). Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *J Immunol* 170, 2153-2160.
- Zhang, G.X., Yu, S., Gran, B., Li, J., Siglienti, I., Chen, X., Calida, D., Ventura, E., Kamoun, M., and Rostami, A. (2003b). Role of IL-12 receptor beta 1 in regulation of T cell response by APC in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 171, 4485-4492.

Zhang, Y.Y., Li, S.F., Qian, S.W., Liu, Y., Tang, Q.Q., and Li, X. (2012). Phosphorylation prevents C/EBPbeta from the calpain-dependent degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 419, 550-555.

Zhou, L., Ivanov, I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., and Littman, D.R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 8, 967-974.

Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S.L., Jeker, L.T., Penaranda, C., Martinez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M., Rosenthal, W., and Bluestone, J.A. (2009). Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol* 10, 1000-1007.

Ziegler, A.G., Pflueger, M., Winkler, C., Achenbach, P., Akolkar, B., Krischer, J.P., and Bonifacio, E. (2011). Accelerated progression from islet autoimmunity to diabetes is causing the escalating incidence of type 1 diabetes in young children. *J Autoimmun* 37, 3-7.

12 Annexe

12.1 GM-CSF Induces Bone Marrow Precursors of NOD Mice to Skew into Tolerogenic Dendritic Cells that Protect Against Diabetes

Simon Gaudreau^{1,a}, Chantal Guindi^{1,a}, Michaël Ménard^a, Ahmed Benabdallah^a, Gilles Dupuis^a and Abdelaziz Amrani^{1,a}

Cell Immunol. 2010;265(1):31-6. Epub 2010 Jun 25.

^a Department of Pediatrics, Immunology Division, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 5N4

Received 10 May 2010;

accepted 21 June 2010.

Available online 25 June 2010.

Abstract

We have reported that GM-CSF treatment of NOD mice suppressed diabetes by increasing the number of tolerogenic dendritic cells (tDCs) and Tregs in the periphery. Here, we have investigated whether GM-CSF acted on NOD bone marrow DCs precursors to skew their differentiation to tDCs. DCs were generated from the bone marrow of GM-CSF-treated (GM.BMDCs) and PBS-treated (PBS.BMDCs) NOD mice and were assessed for their ability to acquire tolerogenic properties. Upon LPS stimulation, GM.BMDCs became fully mature, expressed high levels of PD-L1 and produced more IL-10 and less IL-12p70 and IFN- γ than PBS.BMDCs. In addition, LPS-stimulated GM.BMDCs possessed a reduced capacity to activate diabetogenic CD8⁺ T cells in a PD-1/PD-L1-dependent manner. A single injection of LPS-stimulated GM.BMDCs in NOD mice resulted in long-term protection from diabetes, in contrast to LPS-stimulated PBS.BMDCs. Our results showed that GM-CSF-treatment acted on bone marrow precursors to skew their differentiation into tDCs that protected NOD mice against diabetes.

Keywords: Tolerogenic dendritic cells; GM-CSF; Type 1 diabetes; Autoimmunity; PD-L1; PD-L2

SG and CG hold Ph.D. scholarships from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). MM is recipient of a summer scholarship from Diabetes Quebec. AA is a Canadian Diabetes Association New Investigator and the holder of a Chercheur Boursier Junior 2 from the FRSQ.

Corresponding author. Fax: +1 819 564 5215.

¹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

The induction of tolerance is critical for the maintenance of immune homeostasis and the prevention of autoimmunity. Defects in the number and function of tolerogenic BM-derived and splenic DCs play a critical role in the breakdown of T cell tolerance in the experimental model of spontaneous autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice [1] and [2]. Emerging evidence has revealed the involvement of GM-CSF in controlling immunogenic or tolerogenic function of DCs [3]. We and others have reported that GM-CSF protected NOD mice from diabetes by re-establishing tolerogenic functions of splenic DCs and maintenance of the Treg pool [4] and [5]. We also showed that tolerogenic splenic DCs were required for the suppressive function of CD4⁺ CD25⁺ Tregs thus for maintaining tolerance of diabetogenic T cells. We further provided evidence that myeloid CD8α⁻ splenic DCs of GM-CSF-treated NOD mice possessed the characteristics of tolerogenic DCs [4]. Others groups have reported that the administration of GM-CSF protected against murine experimental autoimmune thyroiditis by mobilizing semimature tolerogenic DCs, which induced a Th2 immune response or Tregs differentiation [6] and [7].

The tolerogenic functions of DCs are mediated by DCs-T cell interactions and by the cytokines they produce. Tolerogenic DCs exhibit low expression of costimulatory (CD80, CD86, CD40)

and MHC class II molecules, as well as a low capacity to induce proliferation of diabetogenic CD8⁺ T cells, in contrast to fully mature immunogenic DCs. Furthermore, tolerogenic DCs produce low levels of the pro-inflammatory cytokines IFN- γ , TNF- α and IL-12-p70 and enhance the release of the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β [8] and [9].

The present study was designed to determine whether GM-CSF acted on BM precursors of NOD mice to preferentially promote their differentiation into tolerogenic DCs. Data presented here showed that DCs derived from the hematopoietic precursors of GM-CSF-treated NOD mice acquired the signature of tolerogenic myeloid DCs as shown by an increase in the expression of PD-L1 and the production of IL-10, as well as a low capacity to activate diabetogenic CD8⁺ T cells. Of interest, blockade of the PD-1/PD-L1 pathway restored their ability to promote proliferation of diabetogenic CD8⁺ T cells and their cytokine production. Importantly, these high PD-L1-expressing GM.BMDCs were able to confer long-term protection from diabetes when injected to NOD mice. These results suggested that the injection of GM-CSF to NOD mice induced tolerance by skewing the differentiation of bone marrow precursors toward tolerogenic DCs.

Materials and methods

Mice

NOD/Ltj female mice were from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). 8.3-NOD mice were obtained from Dr. Santamaria (University of Calgary, AB) [10]. All mice were housed under pathogen-free conditions and cared for in accordance with the institutional guidelines of the University of Sherbrooke.

Antibodies and flow cytometry

FITC-, PE- and biotin-labelled anti-CD8 (clone 53–6.7), anti-CD4 (clone GK1.5), anti-CD25 (clone 7D4), anti-CD80 (clone 16–10A1), CD86 (clone GL1), anti-CD40, and anti-CD11c (clone HL3) were from BD Biosciences (Mountain View, CA). PE-labeled anti-PD-L1 (clone MIH5) and anti-PD-L2 (clone TY25) were from eBiosciences (San Diego, CA). Flow cytometry data

collected on a FACSCalibur instrument (Becton Dickinson) were analyzed with the FlowJo software (Tree Star Inc. Ashland, OR).

Treatment and diabetes

Three-week-old female NOD mice were injected i.p. with 100 ng/mouse of recombinant murine GM-CSF (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) or PBS. Mice were injected three times a week for the first 3 weeks, followed by two injections a week. Diabetes was monitored by a urine glucose test using Uristix (Bayer, Minneapolis, MN) and confirmed by assessment of blood glucose levels with an Accu-Check Advantage monitoring system (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Diabetes was assessed up to 40 weeks in the case of GM-CSF-treated mice and until diabetes appearance in the case of PBS-treated mice. The animals were considered diabetic following two positive Uristix readings and when blood glucose concentration was >15 mmol/l.

Generation and analysis of BMDCs

BMDC were generated with GM-CSF (5 ng/ml) and IL-4 (4,5 ng/ml) (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN) as previously reported [4]. At day 7, BMDCs were left un-stimulated or exposed to LPS (1 µg/ml for 24 h or 48 h) in the absence or in the presence of exogenous IL-10 (10 ng/ml). BMDCs phenotypes were analyzed by FACS and their production of cytokines measured by ELISA assays.

Proliferation assay

Naïve splenic 8.3-CD8⁺ T cells purified from 8.3-NOD mice using magnetic beads kit (Miltenyi Biotec, Inc., Auburn, CA) were co-cultured with irradiated BMDCs previously pulsed with the NRP-A7 (1 µg/ml) or the TUM (1 µg/ml, control) peptide and cell proliferation and cytokine production were assayed, as described before [4]. As stated in the legends of the figures, some experiments were performed in the presence of 10 µg/ml of isotype control (rat IgG2a) or blocking antibodies directed against anti-PD-L1 (clone MIH5) or anti-PD-L2 (clone TY25).

Adoptive transfer experiments

Three week-old female NOD/LTJ mice were injected intravenously with BMDCs and monitored for diabetes.

Histopathology

Pancreata were fixed in formalin, embedded in paraffin, sectioned, and stained with haematoxylin/eosin. Islet insulitis was scored as follows: 0, healthy islet; 1, peri-insulitis; 2, leukocytic infiltration of up to 25% of islet mass; 3, leukocytic infiltration of up to 75% of the islet mass; and 4, less than 20% of islet mass remaining.

Statistical analyses

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Student's *t*-test, two-way ANOVA and χ^2 tests were used for statistical analysis. Differences were considered significant for $p < 0.05$.

Results

Phenotype and functions of BMDCs generated from GM-CSF-treated NOD mice

First, we asked whether a treatment of NOD mice with GM-CSF would affect the differentiation of BM precursors into DCs that possessed tolerogenic properties, as we previously reported in the case of splenic DCs [4]. To address this question, DCs were derived from BM precursors of diabetes free GM-CSF- or diabetic PBS- (control) treated NOD mice and were cultured with a combination of GM-CSF and IL-4. These conditions are known to induce BM-derived DCs (BMDCs) of NOD mice to exhibit abnormal maturation that is associated with an increased production of pro-inflammatory cytokines and an increased capacity to activate diabetogenic T cells *in vitro* [4] and [11]. FACS analysis revealed that GM.BMDCs or PBS.BMDCs were phenotypically immature (Fig. 1A and B). However, both types of cells displayed a similar fully mature phenotype following exposure to LPS, as revealed by increased expressions of CD80, CD86 and CD40 (Fig. 1A and B). Interestingly, GM.BMDCs produced lower amounts of IL-

12p70 and IFN- γ ($p < 0.001$) and increased their production of IL-10 ($p < 0.001$) as compared to PBS.BMDCs (Fig. 1C, D and E). Similar observations have been reported in the case of mature tolerogenic DCs [8] and [12]. No significant differences were found between BMDCs of the two groups of mice with respect to the production of IL-6 and TNF α (data not shown).

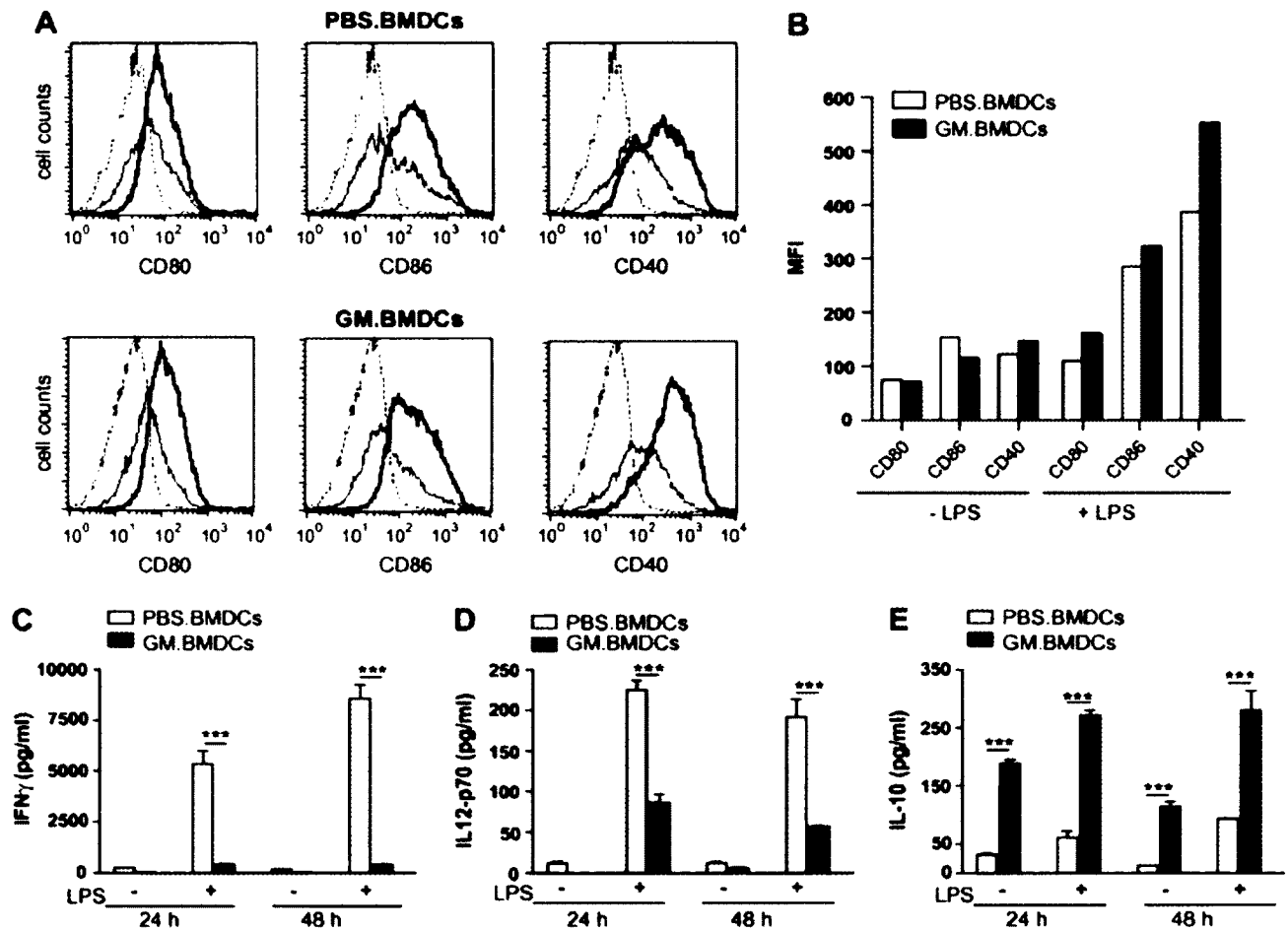


Fig. 1. Phenotype and function of PBS.BMDCs and GM.BMDCs.

BMDCs were derived from (A) diabetic PBS-(PBS.BMDCs) or diabetes free GM-CSF-(GM.BMDCs) treated NOD mice and analyzed by FACS for the expression of CD80, CD86 and CD40 before (thin line) and after (bold line) stimulation with LPS (1 μ g/ml) for 48 h, respectively. The dotted line corresponds to the isotype control antibody. (B) Mean fluorescence intensity (MFI) of CD80, CD86 and CD40 expression on PBS.BMDCs or GM.BMDCs before and after 48 h stimulation with LPS (1 μ g/ml). The data are representative of three independent experiments. In the case of cytokines production, PBS.BMDCs and GM.BMDCs were left untreated or were exposed to LPS (1 μ g/ml) for 24 or 48 h, as indicated. Supernatants were collected and cytokines quantified by ELISA assays for (C) IFN- γ , (D) IL-12p70 and (E) IL-10. Data are expressed as the average \pm SEM and are representative of four independent experiments. (***) $p < 0.001$.

We next determined the capacity of GM.BMDCs and PBS.BMDCs to induce the proliferation of antigen-specific diabetogenic 8.3-CD8⁺ T cells. We found that un-stimulated BMDCs from both groups of mice possessed a similar ability to induce the proliferation of 8.3-CD8⁺ T cells (Figure 2A). However, LPS-matured GM.BMDCs were less potent than LPS-matured PBS.BMDCs to induce the proliferation of 8.3-CD8⁺ T cells (Figure 2B). In addition, there was a significant decrease in the productions of IL-2 and IFN- γ (Figure 2C and D). These results indicated that GM-CSF acted on DCs progenitors in the bone marrow of NOD mice to skew their differentiation to DCs endowed with tolerogenic properties.

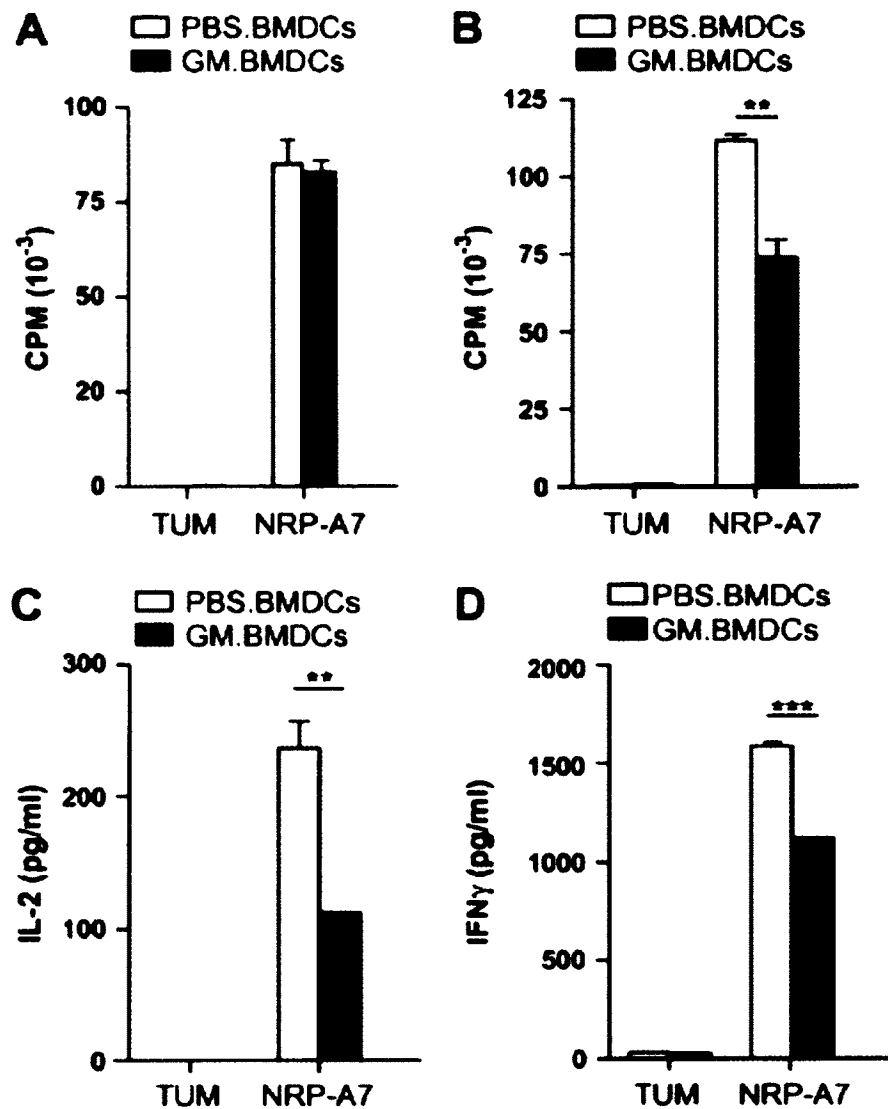


Fig. 2. Proliferative response and cytokines production by diabetogenic 8.3-CD8⁺ T cells cultured in the presence of GM.BMDCs or PBS.BMDCs.

(A) Proliferative response of naive 8.3-CD8⁺ T cells to NRP-A7 or TUM (control) peptide-pulsed (1 μg/ml) irradiated un-stimulated PBS.BMDCs or GM.BMDCs. (B) Proliferative response of naive 8.3-CD8⁺ T cells to NRP-A7 or TUM (control) peptide-pulsed (1 μg/ml) irradiated LPS-stimulated PBS.BMDCs or GM.BMDCs. (C) Production of IL-2 and (D) IFN-γ by naive 8.3-CD8⁺ T cells in response to NRP-A7 or TUM (control) peptide-pulsed (1 μg/ml) irradiated LPS-stimulated PBS.BMDCs or GM.BMDCs. Data are expressed as the average ± SEM and are representative of three independent experiments. (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Contribution of elevated PD-L1 expression on GM.BMDCs to the reduced proliferation and cytokine production of diabetogenic CD8⁺ T cells

Previous studies have shown that exposure of DCs to GM-CSF resulted in increased expression of PD-L1 and PD-L2 [13]. Furthermore, blockade of the PD-L1/PD-1 inhibitory pathway increased proliferation and cytokine production of CD8⁺ T cells [14]. We thus investigated the contribution of PD-L1 and PD-L2 in the tolerogenic function of GM.BMDCs. FACS results showed that un-stimulated GM.BMDCs displayed significantly higher levels of PD-L1 in comparison with PBS.BMDCs, although the levels of PD-L2 were similar (Fig. 3A and B). Interestingly, there was a larger increase of PD-L1 expression in LPS-stimulated GM.BMDCs than in PBS.BMDCs (Fig. 3A and B). However, there were no differences in the expression of PD-L2 in LPS-stimulated BMDCs of both groups of mice. The increased levels PD-L1 and the reduced capacity of GM.BMDCs to activate diabetogenic CD8⁺ T cells were not the result of elevated production of IL-10. This interpretation was based on the finding that PBS.BMDCs stimulated with LPS in the presence of exogenous IL-10 expressed similar levels of PD-L1 and PD-L2 (Fig. 3C) and they induced the proliferation of 8.3-CD8⁺ T cells in a manner similar to LPS-stimulated PBS.BMDCs (Fig. 3D).

We next determine the influence of PD-1/PD-L1 and PD-1/PD-L2 on proliferation and cytokine production of 8.3-CD8⁺ T cells cultured in the presence of GM.BMDCs. We found that pre-incubation of LPS-activated GM.BMDCs with an anti-PD-L1 blocking antibody restored proliferation of 8.3-CD8⁺ T cells (Fig. 3E) and production of IL-2 and IFN- γ to levels observed in LPS-stimulated PBS.BMDCs (Fig. 3F and G). Unexpectedly, the anti-PD-L2 blocking Ab reduced proliferation of 8.3-CD8⁺ T cells in the presence of BMDCs of both groups of mice (Fig. 3E). In addition, the production of IL-2 and IFN- γ was significantly more reduced in the presence of GM.BMDCs than in the presence of PBS.BMDCs ($p < 0.01$) (Fig. 3F and G). These data supported the interpretation that the PD-1/PD-L1 inhibitory pathway contributed to the reduced expansion of diabetogenic 8.3-CD8⁺ T cells and the production of IL-2 and IFN- γ when cultured in the presence of GM.BMDCs.

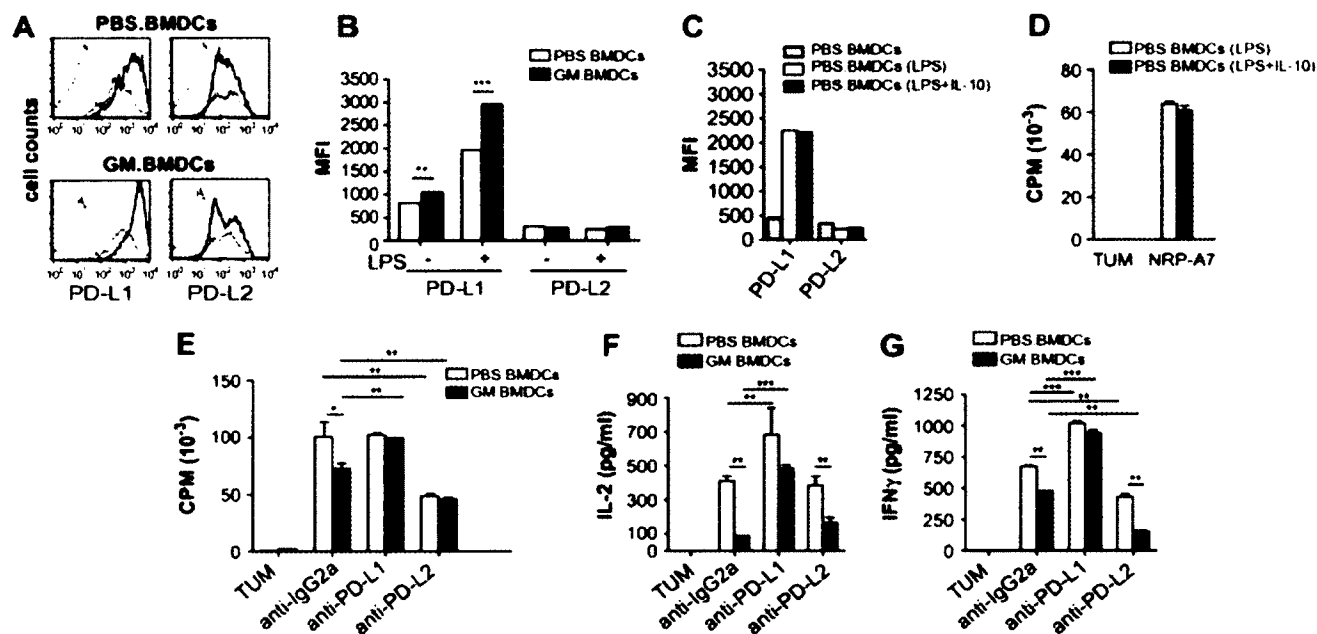


Fig. 3. PD-L1 and PD-L2 expression and function on GM.BMDCs and PBS.BMDCs.

(A) FACS analysis of the expression of PD-L1 and PD-L2 on PBS.BMDCs or GM.BMDCs before (thin line) and after (bold line) 48 h stimulation with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$). The dotted line corresponds to the isotype control antibody. (B) FACS data represented as mean fluorescence intensity (MFI). (C) MFI of PD-L1 and PD-L2 expression on PBS.BMDCs stimulated with LPS in the absence or in the presence of IL-10 (10 ng/ml). (D) Proliferative response of naive 8.3-CD8⁺ T cells to NRP-A7 or TUM (control) peptide- (1 $\mu\text{g/ml}$) pulsed irradiated PBS.BMDCs stimulated with LPS in the absence or in the presence of IL-10 (10 ng/ml). (E) Proliferative response of naive 8.3-CD8⁺ T cells to NRP-A7 or TUM (control) peptide- (1 $\mu\text{g/ml}$) pulsed irradiated mature PBS.BMDCs or GM.BMDCs cultured in the presence of blocking monoclonal antibodies directed against PD-L1 (10 $\mu\text{g/ml}$), PD-L2 (5 $\mu\text{g/ml}$) or control antibody (10 $\mu\text{g/ml}$). (F) Production of IL-2 and, (G) IFN- γ by naive 8.3-CD8⁺ T cells in response NRP-A7 or TUM (control) peptide-pulsed (1 $\mu\text{g/ml}$) irradiated PBS.BMDCs or GM.BMDCs cultured in the presence of blocking monoclonal antibodies directed against PD-L1 (10 $\mu\text{g/ml}$), anti-PD-L2 (5 $\mu\text{g/ml}$) or control antibody (10 $\mu\text{g/ml}$). Data are expressed as the average \pm SEM and are representative of three independent experiments. (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

Induction of long-term protection against diabetes by GM.BMDCs

The results of the *in vitro* studies described above led us to investigate the capacity of tolerogenic GM.BMDCs to prevent diabetes development in NOD mice. Three week-old NOD mice received a single injection of un-stimulated or LPS-stimulated BMDCs and were monitored for the development of diabetes over 36 weeks. Results showed that un-stimulated GM.BMDCs and PBS.BMDCs did not protect from diabetes development (100% and 80% diseased animals, respectively) (Fig. 4A). However, LPS-stimulated PBS.BMDCs delayed ($p < 0.03$) but did not prevent the onset of diabetes (83% diabetic mice) (Fig. 4A). In marked contrast, LPS-stimulated GM.BMDCs significantly ($p < 0.05$) decreased the incidence of the disease (75% of diabetes-free mice) (Fig. 4A) and insulinitis (Fig. 4B and C). These observations provided convincing evidence that a treatment of NOD mice with GM-CSF affected bone marrow precursors to skew their differentiation into tolerogenic DCs that protected against diabetes.

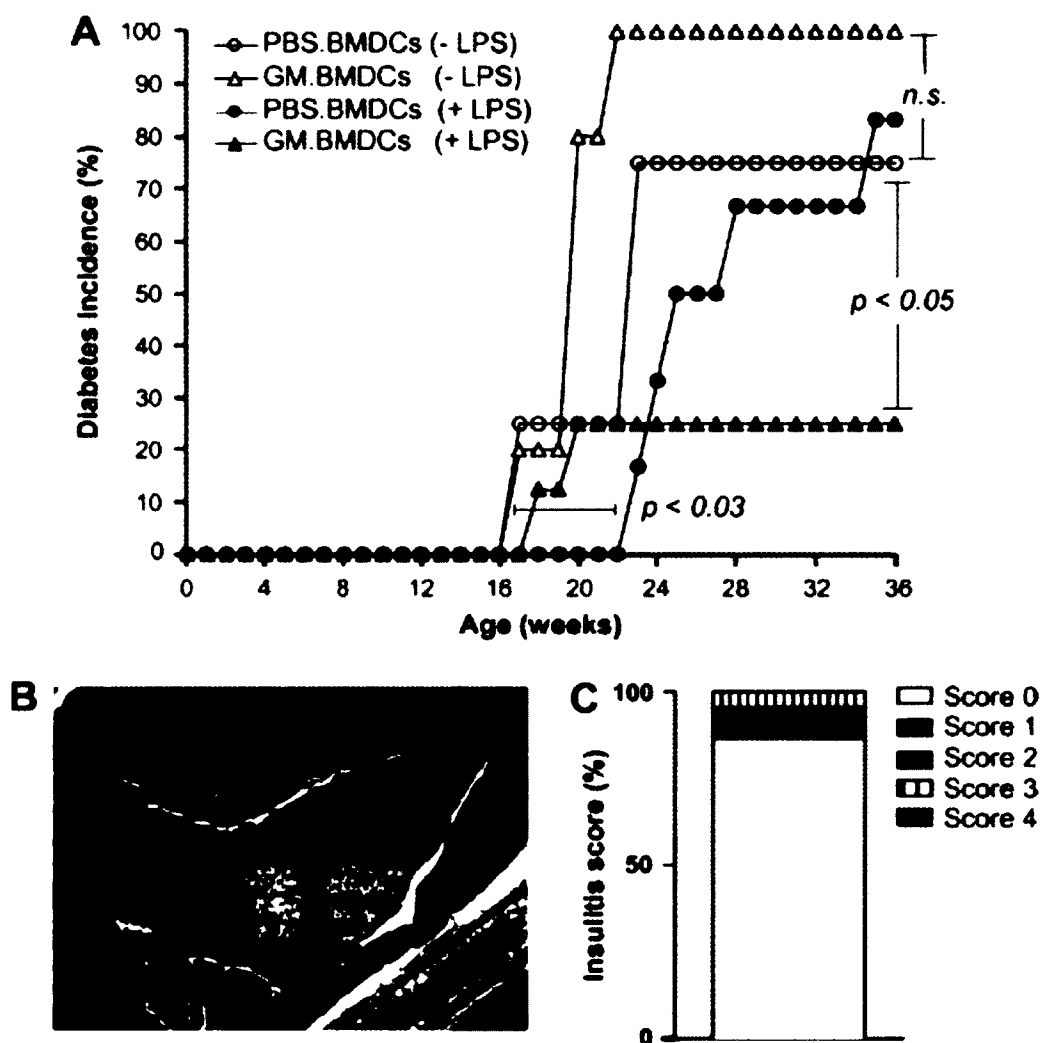


Fig. 4. Inhibition of diabetes development by mature GM.BMDCs.

(A) Un-stimulated or LPS-stimulated PBS.BMDCs or GM.BMDCs (2×10^6 cells) were transfused into 3 week-old pre-diabetic female NOD mice (5–8 mice per group) and followed for diabetes development until 36 weeks of age. (B) Representative microphotographs of haematoxylin-eosin-stained pancreatic sections from NOD mice transfused with GM.BMDCs at 36 weeks of age. (C) Evolution of islets inflammation in NOD mice transfused with LPS-stimulated GM.BMDCs at 36 weeks of age. A minimum of 20 islets were scored from transfused mouse.

Discussion

We report that the treatment of NOD mice with GM-CSF, a key cytokine for DCs differentiation, acted on BM precursors to promote their *in vitro* differentiation into tolerogenic DCs that displayed a fully mature phenotype. These DCs, secreted high amounts of IL-10, produced drastically reduced amounts of IFN- γ and IL-12p70, induced low proliferation of diabetogenic CD8⁺ T cells in a PD-1/PD-L1-dependent manner and maintained long-term protection from diabetes when transferred in NOD mice.

Several lines of evidence support the notion that a combination of impaired development of DCs from myeloid progenitors, abnormal levels of expression of co-stimulatory molecules and production of pro-inflammatory cytokines contribute to diabetes development in NOD mice [15] and [16]. In addition, BMDCs of NOD mice do not secrete IL-10 but produce high amounts of IL-12p70, IFN- γ and are potent stimulators of effectors T cells [15]. We have reported that treatment of NOD mice with GM-CSF prevented the development of diabetes by increasing the number of tolerogenic myeloid CD11c⁺CD8 α ⁻ DCs splenic DCs [4]. DCs arise from hematopoietic stem cells in the bone marrow. The common DCs precursors express GM-CSF receptor alpha as well as transcription factors associated with DCs development [17]. We investigated whether the tolerogenic function of splenic myeloid DCs in GM-CSF-treated NOD mice arose from the effect of GM-CSF on bone precursors. We found that bone marrow cells from GM-CSF-treated NOD mice were differentiated to BMDCs that displayed the signature of mature tolerogenic DCs. These cells produced decreased amounts of IL-12p70 and IFN- γ but high amounts of IL-10, as reported [11]. Interestingly, BMDCs of GM-CSF-treated NOD mice were less effective in activating diabetogenic 8.3-CD8⁺ T cells in an IL-10 independent manner. This observation may result from engagement of PD-1 by its ligands (PD-L1/PD-L2), which compete with the CD80/CD86-dependent costimulation pathway to inhibit T cells response [14]. In this connection, we found that GM.BMDCs expressed similar levels of PD-L2 but higher levels of PD-L1 as compared to PBS.BMDCs. Some studies have suggested that PD-1 and PD-L1/PD-L2 inhibit T cell proliferation and cytokine production [14], [18] and [19], whereas other reports have supported a costimulatory role [20] and [21]. Here, we found that blocking PD-L1 on GM.BMDCs restored CD8⁺ T cell proliferation as well as IL-2 and IFN- γ production. These observations indicated that PD-L1 contributed to suppression of diabetogenic CD8⁺ T cells

response *in vitro*. These results were in agreement with previous reports, 1) that GM-CSF increased the expression of PD-L1 on BMDCs [13], 2) that BMDCs generated with GM-CSF were poor stimulators of CD4⁺ or CD8⁺ T cells [11], [22] and [23] and, 3) that there was reduced IFN- γ production in a PD-1/PD-L1 dependent manner [19] and [24]. In addition, PD-L1 blockade resulted in increased proliferation of diabetogenic 8.3-CD8⁺ T cells. Furthermore, our data were in agreement with the findings that, in NOD mice, PD-L1 blockade enhanced proliferation of transferred diabetogenic 8.3-CD8⁺ T cells [25]. In addition, a recent study by Yadav *et al.* showed that blockade of PD-L1 modestly increased proliferation of diabetogenic CD8⁺ T cells and that blockade of PD-L1 and B7-DC did not affect CD8⁺ T cell proliferation [26]. Here, blocking PD-L2 resulted in a similar reduction of 8.3-CD8⁺ T cell proliferations, whereas a marked impaired production of IL-2 and IFN- γ was observed only in the presence of GM.BMDCs. This observation suggested that PD-L2 blockade allowed a more favored interaction between PD-L1 and PD-1 in GM.BMDCs which resulted in a marked decrease of CD8⁺ T cell response. In agreement with this interpretation, a decreased expression of PD-L1 in the spleen and PLN of NOD mice compared to diabetes-resistant C57BL/6 mice has recently been reported [27]. The bulk of these data suggested that an altered availability of PD-1/PD-L1 failed to control autoimmune response in NOD mice. In support of this idea, our data convincingly showed that GM-CSF enhanced PD-L1 expression on BMDCs of NOD mice and reestablished their tolerogenic function *in vitro*. The tolerogenic function of GM.BMDCs has also been confirmed *in vivo* since transfusion of young NOD mice with highly PD-L1-expressing BMDCs induced a prolonged protection from diabetes. Further studies will be needed to clarify whether the tolerogenic properties of GM.BMDCs are dependent on GM-CSF or whether a long-term treatment with GM-CSF causes intrinsic changes in myeloid progenitors.

In conclusion, our data provide convincing evidence that the treatment of NOD mice with GM-CSF affected BM precursors that differentiated into tolerogenic DCs *in vitro*. Furthermore, our data demonstrated that BM-derived DCs from GM-CSF-treated NOD mice attenuated the effector function of diabetogenic CD8⁺ T cells in a PD1/PD-L1 dependent manner and provide a long-term protection from diabetes when transferred into NOD mice.

Conflict of interest

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by research grants from the Juvenile Diabetes Foundation International and the Canadian Institute for Health Research awarded to AA.

References

- [1] A.M. Marleau, K.L. Summers and B. Singh, Differential contributions of APC subsets to T cell activation in nonobese diabetic mice, *J. Immunol.* **180**(2008), pp. 5235–5249.
- [2] D.V. Serreze, H.R. Gaskins and E.H. Leiter, Defects in the differentiation and function of antigen presenting cells in NOD/Lt mice, *J. Immunol.* **150**(1993), pp. 2534–2543.
- [3] J.A. Hamilton, Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity, *Nat. Rev. Immunol.* **8** (2008), pp. 533–544.
- [4] S. Gaudreau, C. Guindi, M. Menard, G. Besin, G. Dupuis and A. Amrani, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prevents diabetes development in NOD mice by inducing tolerogenic dendritic cells that sustain the suppressive function of CD4+CD25+ regulatory T cells, *J. Immunol.* **179**(2007), pp. 3638–3647.
- [5] D. Cheatem, B.B. Ganesh, E. Gangi, C. Vasu, and B.S. Prabhakar, Modulation of dendritic cells using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) delays type 1 diabetes by enhancing CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Clin Immunol* (2009).
- [6] C. Vasu, R.N. Dogan, M.J. Holterman and B.S. Prabhakar, Selective induction of dendritic cells using granulocyte macrophage-colony stimulating factor, but not fms-like tyrosine kinase receptor 3-ligand, activates thyroglobulin-specific CD4+/CD25+ T cells and suppresses experimental autoimmune thyroiditis, *J. Immunol.* **170** (2003), pp. 5511–5522.
- [7] E. Gangi, C. Vasu, D. Cheatem and B.S. Prabhakar, IL-10-producing CD4+CD25+ regulatory T cells play a critical role in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced suppression of experimental autoimmune thyroiditis, *J. Immunol.* **174** (2005), pp. 7006–7013.

- [8] S. Rutella, S. Danese and G. Leone, Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age, *Blood* **108** (2006), pp. 1435–1440.
- [9] K. Steinbrink, K. Mahnke, S. Grabbe, A.H. Enk and H. Jonuleit, Myeloid dendritic cell: From sentinel of immunity to key player of peripheral tolerance?, *Hum. Immunol.* **70** (2009), pp. 289–293.
- [10] J. Verdaguer, D. Schmidt, A. Amrani, B. Anderson, N. Averill and P. Santamaria, Spontaneous autoimmune diabetes in monoclonal T cell nonobese diabetic mice, *J. Exp. Med.* **186** (1997), pp. 1663–1676.
- [11] M.B. Lutz, N.A. Kukutsch, M. Menges, S. Rossner and G. Schuler, Culture of bone marrow cells in GM-CSF plus high doses of lipopolysaccharide generates exclusively immature dendritic cells which induce alloantigen-specific CD4 T cell anergy in vitro, *Eur. J. Immunol.* **30** (2000), pp. 1048–1052.
- [12] S. Yamazaki, T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba and R.M. Steinman, Direct expansion of functional CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells, *J. Exp. Med.* **198** (2003), pp. 235–247.
- [13] T. Yamazaki, H. Akiba, H. Iwai, H. Matsuda, M. Aoki, Y. Tanno, T. Shin, H. Tsuchiya, D.M. Pardoll, K. Okumura, M. Azuma and H. Yagita, Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC, *J. Immunol.* **169** (2002), pp. 5538–5545.
- [14] M.E. Keir, G.J. Freeman and A.H. Sharpe, PD-1 regulates self-reactive CD8⁺ T cell responses to antigen in lymph nodes and tissues, *J. Immunol.* **179**(2007), pp. 5064–5070.
- [15] A.M. Marleau and B. Singh, Myeloid dendritic cells in non-obese diabetic mice have elevated costimulatory and T helper-1-inducing abilities, *J. Autoimmun.* **19** (2002), pp. 23–35.
- [16] R.J. Steptoe, J.M. Ritchie and L.C. Harrison, Increased generation of dendritic cells from myeloid progenitors in autoimmune-prone nonobese diabetic mice, *J. Immunol.* **168** (2002), pp. 5032–5041.
- [17] C. Ardavin, Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells, *Nat. Rev. Immunol.* **3** (2003), pp. 582–590.
- [18] Y. Latchman, C.R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, Y. Iwai, A.J. Long, J.A. Brown, R. Nunes, E.A. Greenfield, K. Bourque, V.A. Boussiotis, L.L. Carter, B.M. Carreno, N. Malenkovich, H. Nishimura, T. Okazaki, T. Honjo, A.H. Sharpe and G.J. Freeman,

PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation, *Nat. Immunol.* **2** (2001), pp. 261–268.

[19] S.E. Sandner, M.R. Clarkson, A.D. Salama, A. Sanchez-Fueyo, C. Domenig, A. Habicht, N. Najafian, H. Yagita, M. Azuma, L.A. Turka and M.H. Sayegh, Role of the programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune responses *in vivo*, *J. Immunol.* **174** (2005), pp. 3408–3415.

[20] H. Dong, G. Zhu, K. Tamada and L. Chen, B7–H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion, *Nat. Med.* **5** (1999), pp. 1365–1369.

[21] S.Y. Tseng, M. Otsuji, K. Gorski, X. Huang, J.E. Slansky, S.I. Pai, A. Shalabi, T. Shin, D.M. Pardoll and H. Tsuchiya, B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells, *J. Exp. Med.* **193** (2001), pp. 839–846.

[22] M.B. Lutz, R.M. Suri, M. Niimi, A.L. Ogilvie, N.A. Kukutsch, S. Rossner, G. Schuler and J.M. Austyn, Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival *in vivo*, *Eur. J. Immunol.* **30** (2000), pp. 1813–1822.

[23] P. Kleindienst, C. Wiethe, M.B. Lutz and T. Brocker, Simultaneous induction of CD4 T cell tolerance and CD8 T cell immunity by semimature dendritic cells, *J. Immunol.* **174** (2005), pp. 3941–3947.

[24] C. Baecher-Allan, J.A. Brown, G.J. Freeman and D.A. Hafler, CD4+CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood, *J. Immunol.* **167** (2001), pp. 1245–1253.

[25] I. Guleria, M. Gubbels Bupp, S. Dada, B. Fife, Q. Tang, M.J. Ansari, S. Trikudanathan, N. Vadivel, P. Fiorina, H. Yagita, M. Azuma, M. Atkinson, J.A. Bluestone and M.H. Sayegh, Mechanisms of PDL1-mediated regulation of autoimmune diabetes, *Clin. Exp. Immunol.* **125** (2007), pp. 16–25.

[26] D. Yadav, N. Hill, H. Yagita, M. Azuma and N. Sarvetnick, Altered availability of PD-1/PD ligands is associated with the failure to control autoimmunity in NOD mice, *Cell. Immunol.* **258** (2009), pp. 161–171.

[27] S.C. Liang, Y.E. Latchman, J.E. Buhlmann, M.F. Tomczak, B.H. Horwitz, G.J. Freeman and A.H. Sharpe, Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses, *Eur. J. Immunol.* **33** (2003), pp. 2706–2716.